



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**EFEITOS DO TRATAMENTO ÁCIDO NO INÓCULO SOBRE A PRODUÇÃO E
MASSA MOLAR DO ÁCIDO HIALURÔNICO**

Marina Vieira

Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Campinas – São Paulo
Outubro/2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

V673e Vieira, Marina
 Efeitos do tratamento ácido no inóculo sobre a
 produção e massa molar do ácido hialurônico / Marina
 Vieira. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

 Orientador: Maria Helena Andrade Santana.
 Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

 1. Fermentação. 2. Estreptococo. 3. Metabólitos. 4.
 Ácido hialurônico. I. Santana, Maria Helena Andrade.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Effects of the acid stress in the inoculum on the
 production and molecular weight of hyaluronic acid

Palavras-chave em Inglês: Fermentation, Streptococcus, Metabolites,
 Hyaluronic acid

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos


Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Reinaldo Gaspar Bastos, Arnaldo Márcio Ramalho
 Prata

Data da defesa: 21-10-2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por **Marina Vieira** e aprovada em 21 de outubro de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana



Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos



Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de mestrado em Engenharia Química defendida por Marina Vieira e aprovada pela comissão julgadora em 21 de outubro de 2011.



Prof.^a. Dr.^a. Maria Helena Andrade Santana

Campinas, 2011

*Aos meus pais,
por todo o apoio, credibilidade e amor
que depositaram em mim para o desenvolvimento desse trabalho.*

*Ao meu noivo,
amor de minha vida, por tudo o que fez por mim,
me ajudando, me amparando, me amando.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas e ao Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química, pela oportunidade concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À **Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana**, pela oportunidade, pela orientação, pela confiança, compreensão para o desenvolvimento deste trabalho.

À amiga **Dra. Aline Mara Barbosa Pires**, por ter me passado todo o conhecimento desse processo tão complexo, pela paciência comigo, por toda a ajuda e dicas durante o decorrer desse projeto, pela amizade, por fazer parte da minha vida como minha amiga e confidente. Fico honrada em ter aprendido tudo o que sei desse processo com você, minha amiga querida.

Ao **Professor Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata**, pela participação da minha banca examinadora.

Ao **Dr. Reinaldo Gaspar Bastos**, pelas contribuições, sugestões e pela participação na banca examinadora.

Ao **Prof. Dr. César Costapinto Santana**, por disponibilizar a utilização do sistema cromatográfico e das dependências do Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas (LPCR).

Ao querido amigo **Gilson Jr.**, técnico do LDPB, pela ajuda, dicas, sugestões pelo desenvolvimento deste trabalho e também pela amizade e carinho.

Ao colega **Dr. André Casimiro de Macedo**, pelas dicas e compartilhamento das experiências tristes e alegres que ocorrem em uma fermentação.

Ao querido amigo **Felipe**, muito obrigada por todas as vezes que você me ajudou, me escutou, me confortou. Obrigada pelos momentos divertidos e até mesmo os tristes que passamos no laboratório de fermentação. Você é uma pessoa muito especial, um amigo muito querido.

A minha primeira “aluna” de iniciação científica **Marina Brito Oliveira**, pela cooperação, ajuda e carinho. Muito sucesso na sua carreira profissional.

Ao amigo “elétrico” **Leandro**, pela amizade, carinho e dicas para “melhorarmos as fermentações”.

A todos os colegas que passaram pelo LDPB durante o período deste trabalho, em especial à **Caroline, Thiago, Amanda, Rafaela, Andréa, Patrícia, Gabi, Viviane, Julia Trevisan, Leandra**.

Aos colegas que passaram pelo LPCR durante o período deste trabalho, em especial à **Absolon, Ana Carolina** e à minha querida amiga **Anayla**. Obrigada por tudo o que você fez por mim, por toda a ajuda, pela torcida, por dividir comigo as alegrias e tristezas. Você é muito especial!

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química, em especial a **Rosa**, pelo carinho.

Aos amigos dos outros laboratórios: **Nemailla Bonturi, Ana Kelly, Itiara, Márcia, Gisele** pelos momentos agradáveis que passamos juntas.

Às minhas amadas amigas **Loriane Maeda, Monique Bachega, Deise do Rosário, Priscila Maziero, Fernanda Verdelli** pela nossa eterna amizade.

Um agradecimento especial para a minha amiga **Profa. Dra. Juliana Daguano** por sempre estar disponível todas as vezes que precisei de seus conhecimentos acadêmicos; sempre disposta a fazer o possível e o impossível para me ajudar; pelo carinho e preocupação comigo.

A toda minha família, em especial aos **meus pais**, por sempre acreditarem em mim, me amarem incondicionalmente, vocês são tudo para mim e este trabalho dedico a vocês.

Ao amor de minha vida, meu noivo **Alessandro Carrare Arrigoni**, que daqui a pouco tempo seremos marido e mulher, pelo apoio, amor, carinho, cumplicidade, dicas, paciência e por sempre estar disposto em me ajudar todas as vezes que precisei de você. Amo você.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A Deus por me dar forças para concluir este projeto e colocar todas essas pessoas maravilhosas em minha vida.

“A diferença entre o possível e o impossível está na maneira de pensar.”

John River

RESUMO

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo composto de 2000-25000 unidades dissacarídicas de ácido glucurônico e N-acetilglicosamina formado por ligações β -1,3 e β -1,4 alternadamente. Devido suas propriedades físico-químicas como: poder lubrificante, ser hidrofílico e biocompatível, o AH tem sido amplamente aplicado na área médica. Muitos estudos comprovam que a produção de AH por processo fermentativo microbiano possibilita sua otimização por meio do conhecimento dos requerimentos nutricionais das células e controle das condições de cultivo como pH e temperatura. O pH ótimo de crescimento bacteriano e de produção do AH é 7,0, embora pHs fora da neutralidade (quando se é aplicado um tratamento ácido) induzam mudanças metabólicas com reflexos na produção de AH. Os efeitos do pH ainda são pouco reportados na literatura, principalmente quanto ao tratamento na região ácida. Neste trabalho, em sua primeira etapa, estudou-se os efeitos do tratamento do inóculo em pHs 4,5, 5,0 e 5,5 e com tempos de 15, 30 e 60 minutos. Foi utilizado um ácido orgânico (acético) e um inorgânico (clorídrico). As fermentações foram conduzidas sem aeração forçada, em frascos, com pH 7,0. A melhor produção do AH (0,74 g/L) foi obtida com o tratamento utilizando ácido clorídrico, comparado ao tratamento com ácido acético (0,49 g/L), e com o inóculo sem tratamento ácido (0,31 g/L), usado como controle. Na segunda etapa deste trabalho foi estudado o efeito do tratamento ácido no inóculo utilizando reator de tanque agitado com aeração forçada, nas melhores condições determinadas na primeira etapa, onde foi observada uma maior produção de AH (2,5 g/L) quando utilizadas as condições: tratamento ácido no inoculo, pH 7,0 e 2vvm de aeração durante a fermentação. Na terceira etapa do trabalho foi realizado um estudo utilizando cardiolipina no meio de cultivo (*in vivo*), sendo observado que a cardiolipina desempenha um papel importante quando se quer alcançar uma alta massa molar para o AH.



ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) is a polysaccharide composed of 2000-25000 disaccharidic units of glucuronic acid and N-acetylglucosamine β -bonds formed by 1-3 and 1-4 β -turn. Due its physicochemical properties such as lubricity, hydrophilic and biocompatible, HA has been widely applied in the medical field. Many Studies show that production of HA by fermentation microbial allows optimization through cells nutritional requirements knowledge and control conditions cultivation as pH and temperature. The optimum pH for growth and production HA is 7.0, while the pH was neutral ("stress") which induces metabolic changes with repercussions on the production of HA. The effects of pH are poorly reported in the literature, especially regarding acid treatment in the region. In this paper, in first stage, were studied the effects of treatment in the inoculum pH 4.5, 5.0 and 5.5 and with times of 15, 30 and 60 minutes. We used the organic acid (Acetic) and inorganic (hydrochloric acid). The fermentations were conducted without forced aeration in flasks with pH 7.0. The best production of the AH (0.74 g / L) was obtained with treatment using hydrochloric acid, compared to treatment with acetic acid (0.49 g / L), and the inoculum untreated acid (0.31 g / L), used as control. In the second stage was studied the effect of the acid stress in the inoculum using stirred tank reactor with forced aeration in the best conditions determined in the first stage. It was observed an increased production of AH (2.5 g / L) when were used the conditions: the acid shock inoculum, pH 7.0 and 2vvm aeration during fermentation. And the third stage of the work was carried out in a study using cardiolipin added in the culture medium (*in vivo*). It was observed that cardiolipin plays an important role when we want to achieve a high molecular weight for AH.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivo.....	4
1.2. Aspectos Abordados e Estrutura do Trabalho.....	4
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Ácido Hialurônico.....	5
2.1.1. Estrutura.....	5
2.1.2. Propriedades e Funções do Ácido Hialurônico.....	7
2.1.3. Fontes do Ácido Hialurônico.....	9
2.1.4. Aplicações do Ácido Hialurônico.....	10
2.2. Produção Microbiana de Ácido Hialurônico.....	12
2.2.1. Bactérias do Gênero <i>Streptococcus</i>	12
2.2.2. Metabolismo do <i>Streptococcus</i>	15
2.2.3. Meios de Cultura.....	18
2.2.3.1. Meios Empregados.....	18
2.2.3.2. Meio Suplementado com Água de Maceração de Milho.....	21
2.3. Condições de Operação do Processo Fermentativo.....	25
2.3.1. Temperatura.....	26
2.3.2. Potencial Hidrogeniônico.....	27
2.3.3. Agitação e Aeração.....	28
2.4. Estratégias para Aumentar a Produção de Ácido Hialurônico no Processo Fermentativo.....	32
2.4.1. Estratégia do Choque Ácido em Bactérias Lácticas.....	32
2.4.2. Estratégia do “Stress” Salino em Bactérias Lácticas.....	38

2.5. Choque Ácido e os Mecanismos de Regulação dos Microrganismos: Fatores e Cofatores de Resposta.....	41
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.1. APRESENTAÇÃO.....	59
(Artigo 1) THE INOCULUM UNDER ACID STRESS INCREASES THE PRODUCTION OF HYALURONIC ACID BY <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	61
(Artigo 2) KINETICS EFFECTS ON THE PRODUCTION OF HYALURONIC ACID WITH INOCULUM UNDER ACID STRESS.....	77
(Artigo 3) INFLUENCE OF CARDIOLIPIN ON THE PRODUCTION OF HYALURONIC ACID BY <i>Streptococcus zooepidemicus</i> CULTIVATION	99
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES.....	111
4.1. CONCLUSÕES.....	111
4.2. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	113

LISTA DE FIGURAS

Figuras do CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Fórmula espacial e molecular da unidade repetitiva dissacarídica, do Ácido Hialurônico, formada por ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetil glicosamina (GlcNAc) (Chong & Blank, 1998)..... 6
- Figura 2** - Estrutura química do ácido hialurônico. (Syang *et al*, 2008)..... 6
- Figura 3** - Células de *Streptococcus zooepidemicus* (bactéria gram-positiva) com suas cápsulas de ácido hialurônico em meio aerado (Chong & Blank, 1998; Ogradowski, 2006)..... 14
- Figura 4** - Via biossintética para produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*. (Chong *et al.*, (2005); Adaptado por Pires, 2009)..... 16

Figuras do CAPÍTULO 3

Figuras do Artigo 1

- Fig. 3.1** - Comparison between cells (a) and HA (b) concentrations after 24 h of fermentation at initial pH 7.0 with an inoculum under acid stresses with HCl and at the absence of stress (control)..... 70
- Fig. 3.2** - Comparison between cells (a) and HA (b) concentrations after 24 h of fermentation at initial pH 7.0 with an inoculum under acid stress with CH₃COOH and at the absence of stress (control)..... 71

Figuras do Artigo 2

Figure 1. Kinetics effects on (a) HA, (b) glucose, (c) cell growth, (d) lactic acid and (e) acetic acid concentrations under uncontrolled pH fermentations at 2vvm aeration, with inoculum (▲) under acid stress and (■) free of acid stress (control).....	86
Figure 2. Kinetics effects of (a) HA, (b) glucose, (c) cell growth, (d) lactic acid and (e) acetic acid concentrations in controlled pH, at 2vvm aeration and inocula (▲) under acid stress and (■) free of acid stress (control).	87
Figure 3. Kinetics effects of (a) HA, (b) glucose, (c) cell growth, (d) lactic acid and (e) acetic acid concentrations in controlled pH, at 2vvm aeration and inoculum (●) under 1vvm aeration and (■) 2vvm (both with acid stress).....	88
Figure 4. Distribution of the molecular weight of hyaluronic acid along fermentations with inoculum under acid stress (a) 2vvm -non-controlled pH, (b) 1vvm – controlled pH and (c) 2vvm – controlled pH. Molecular fraction around (■) 10^7 Da; (■) 10^6 Da and (□) 10^5 Da.....	90

Figuras do Artigo 3

Figure 2. Influence of cardiolipin on the HA production (A) and biomass (B).....	106
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabelas do CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Efeitos do tratamento pré-condicionado de *S. Cerevisiae* YPH499, na ausência de glicose e acidificação do meio externo utilizando ácido acético ou HCl como acidulante, sobre a taxa de mortalidade de levedura específica (kd), a 47 °C e em pH citosólico (PHC).. 34

Tabelas do CAPÍTULO 3

Tabelas do Artigo 1

Table 3.1. Cell Viability after Treatment with HCl and control according to the time exposure (CFU.mL⁻¹)..... 68

Table 3.2. Cell Viability after Treatment with CH₃COOH and control according to the time exposure (CFU.mL⁻¹)..... 69

Table 3.3. Yield (Y_{HA/X}) of HA relative to cells from the fermentations under acid stress with HCl, CH₃COOH and at the absence of acid stress (control)..... 72

Table 3.4. HA molecular weight distribution and average molecular weight..... 73

Tabelas do Artigo 2

Table 1. Performance of batch fermentations under uncontrolled and controlled pH at 2vvm for inoculum of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> under acid stress and free of stress. Effects of aeration at controlled pH with inoculum under acid stress.....	89
--	----

Tabelas do Artigo 3

Table 1. Distribution of fractions of Molecular Weight of HA produced by <i>S. zooepidemicus</i>	107
---	-----



NOMENCLATURAS

6P – Gluconato – DH (via PP)

AB – Albulmina Bovina

AD – Aldeido Desidrogenase

AH – Ácido Hialurônico

AQ – Acetato Quinase

ATP – Adenosina Trifosfato

BAL – Bactérias Ácido Láticas

BL – Bactérias Láticas

CAJ – Suco de Caju

CO₂ – Dióxido de Carbono

CSL – Corn Steep Liquor (água de maceração de milho)

Da – Daltons

DPPH – 2,2 – difenil – 1 – picrilidrazila

EMP – Via Embder – Meyerhof – Parnas

HA – Hyaluronic Acid

HCl – Ácido Clorídrico

HSPC – Proteína de Soja Hidrolisada Concentrada

HAS – Hialuronidase Sintase

IGC – Initial Glucose Concentration (Concentração Inicial de Glicose)

LD – Lactato Desidrogenase

L-RTA – Resposta a Tolerância Ácida

MFA – Análise de Fluxos Metabólicos

MQD – Meio Quimicamente Definido

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Reduzida

NOX – NADH oxidase

P – Isomerase Manose

PFL – Piruvato Formato Liase

TA – Tolerância Ácida

TOD – Taxa de Oxigênio Dissolvido (vvm)

UDP – Uridina Difosfato

UDPN – Acetilglucosamina

WPC – Concentrado Protéico de Soja

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O AH possui cadeia linear, não ramificada e consiste de unidades dissacarídicas polianiónicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetil-glicosamina (GlcNAc) unidas alternadamente por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4. AH existe naturalmente como um gel hidratado encontrado em tecidos humanos e de animais. Esse biopolímero influencia o comportamento celular e apresenta significativas funções estruturais, reológicas, fisiológicas e biológicas no organismo humano.

Quando o AH, um polissacarídeo polianiónico, é incorporado a uma solução aquosa neutra ocorrem ligações por pontes de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos carboxila e N-acetil, conferindo ao polímero capacidade de retenção de água e dureza conformacional, que limita a sua flexibilidade. A molécula pode ainda adotar diferentes conformações que são dependentes do nível de hidratação, do ambiente iônico e da temperatura. Soluções de AH apresentam propriedades viscoelásticas e seu comportamento não ideal tem sido fonte de muito estudo.

A ausência de imunogenicidade ou toxicidade de AH permite sua ampla aplicação nas indústrias cosmética, médica e farmacêutica, incluindo hidratantes para a pele, tratamento de osteoartrite, cirurgia oftalmológica, prevenção de adesão após cirurgia abdominal e cicatrização de ferimentos.

Encontrado naturalmente nos tecidos conjuntivos de mamíferos, o ácido hialurônico pode ser extraído do fluido sinovial, pele, tendões e particularmente do corpo vítreo dos olhos, do cordão umbilical e também da crista de galo ou pode ser produzido por fermentação de *Streptococcus zooepidemicus*. Os polímeros resultantes do microrganismo apresentam mesma estrutura química daqueles encontrados em humanos, podendo diferir apenas com relação à massa molar.

O AH é sintetizado por *S. zooepidemicus* como um fator de virulência do microrganismo. As porções de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina que constituem a molécula de AH são derivadas de glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, respectivamente, e são polimerizados pela enzima hialuronidase sintase.

Estudos sobre a produção microbiana de AH apresentam oportunidades de otimizar o rendimento e qualidade do produto por meio de engenharia genética e controle das condições de cultivo, visto que a maioria dos produtos formados pelos microrganismos é resultado de sua resposta a condições ambientais como nutrientes, vitaminas, íons, temperatura, pH e teor de oxigênio dissolvido.

O crescimento celular de *S. zooepidemicus* compete com a produção de AH por fontes de carbono e energia, enquanto ácido lático pode inibir o crescimento celular e a síntese de AH. Baseado na característica de *S. zooepidemicus*, é esperado que o aumento da produção de AH pode ser realizado pelo redirecionamento do carbono do ácido lático para o ácido acético. Liu *et al*, 2007 conseguiram redirecionar o fluxo de carbono de *S. zooepidemicus* e aumentar a produção de AH sob condições de stress intermitente alcalino durante fermentação em reator tipo tanque agitado.

Entretanto, poucos estudos se referem à estratégia de tratamentos ácidos em *S.zooepidemicus*. Os efeitos do tratamento ácido sobre a fisiologia bacteriana ainda não são conhecidos em detalhe. Mas como em outras bactérias, respostas adaptativas parecem ser um modo habitual de proteção ao tratamento ácido em bactérias lácticas, entretanto, o modo como isto ocorre pode variar entre as espécies.

Estudos proteômicos realizados em bactérias lácticas para o desenvolvimento de tolerância ao tratamento ácido mostram que inúmeras proteínas são induzidas durante a adaptação ácida nessas bactérias, como também o desvio do fluxo de carbono no metabolismo celular.

O redirecionamento do fluxo de carbono da produção do ácido láctico para a produção do ácido acético é uma estratégia vantajosa na produção de AH. Isto porque sua síntese não será inibida pela alta concentração de ácido láctico no meio. Além disso, possibilita a formação de ácido acético que acompanha a produção extra de ATP, que é de extrema importância na síntese de AH.

Desse modo, estudos avaliando a influência do tratamento ácido na produção de AH são escassos, embora seja de muita importância para o aumento da produção de AH e, até mesmo, para um melhor entendimento do funcionamento celular em vias enzimáticas, na síntese desse polissacarídeo tão importante.

Neste trabalho foi realizado o tratamento ácido no inóculo, em diferentes condições, e a fermentação foi conduzida de modo já estudado em trabalhos anteriores do grupo, como no trabalho de Pires (2009). Além disso, foram determinadas as concentrações de AH, concentração celular e formação de metabólitos ao fim do processo fermentativo.

1.1 Objetivo

O presente trabalho tem por objetivo estudar a influência do tratamento ácido no inóculo em ensaios sem aeração forçada e durante a fermentação em reator de tanque agitado com aeração forçada na produção e massa molar do ácido hialurônico produzido por *Streptococcus zooepidemicus*. Foi realizado também o estudo do efeito do fosfolípido cardiolipina quando adicionado no meio de cultivo sob a produção e massa molar do AH.

1.2 Aspectos Abordados e Estrutura do Trabalho

Este trabalho aborda o efeito causado na produção de AH quando o microorganismo *S. zooepidemicus* sofre tratamento ácido. Este assunto será apresentado neste texto sob a forma de artigos científicos. Serão três artigos científicos que abordarão os seguintes aspectos:

- i. Escolha do melhor ácido (orgânico ou inorgânico), tempo de exposição e pH para utilização da estratégia do tratamento ácido.
- ii. Efeitos da utilização de um inóculo que sofreu tratamento ácido (condições encontradas no artigo do item i) em um reator de tanque agitado sob aeração constante.
- iii. Efeitos do tratamento de cardiolipina no meio de cultura sob a produção e massa molar do AH.

CAPÍTULO 2

REVISÃO

BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ácido Hialurônico

2.1.1. Estrutura

O ácido hialurônico (AH) é um membro da família dos glicosaminoglicanos, também chamado de mucopolissacarídeo, e está presente no cimento intercelular dos tecidos animais e nas cápsulas de certas bactérias. O AH é linear, não ramificado e consiste de unidades dissacarídicas polianiónicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidas alternadamente por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4. As figuras 2.1 e 2.2 demonstram a estrutura espacial e química da molécula.

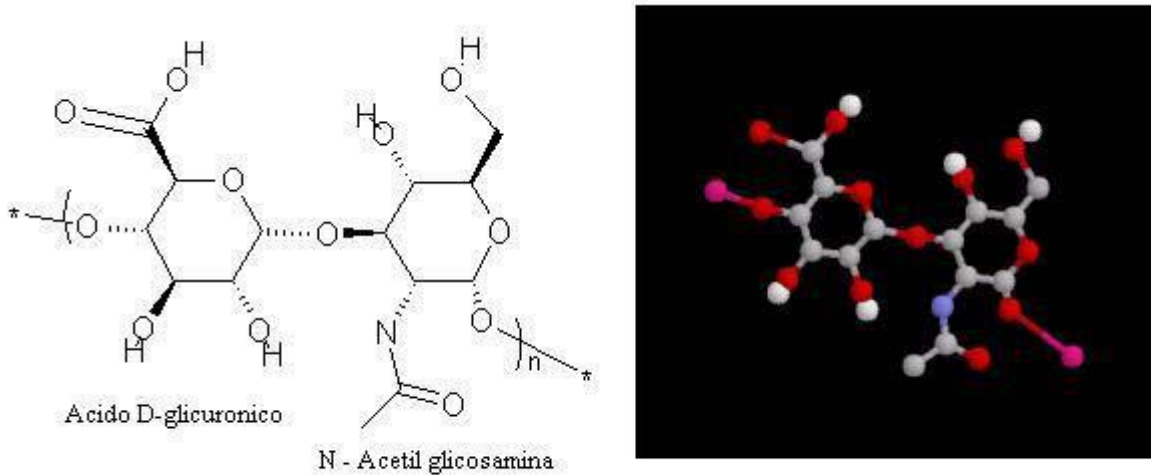


Figura 1 - Fórmula espacial e molecular da unidade repetitiva dissacarídica, do Ácido Hialurônico, formada por ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetil glicosamina (GlcNAc) (Chong & Blank, 1998).

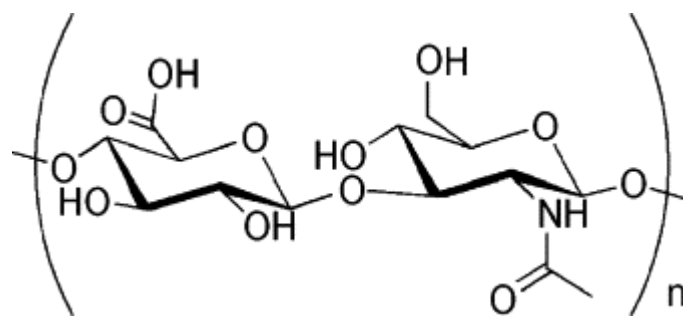


Figura 2 - Estrutura química do ácido hialurônico. (Syang *et al.*, 2008).

O AH pode conter em torno de 30.000 unidades dissacarídicas repetidas na molécula extraída de tecidos animais, o que significaria uma massa superior a 10^7 Da (Weigel *et al.*, 1997).

2.1.2. Propriedades e Funções do Ácido Hialurônico

Quando o AH, um polissacarídeo polianiônico, é incorporado a uma solução aquosa neutra, ocorrem ligações por pontes de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos carboxila e N-acetil, conferindo ao polímero capacidade de retenção de água e dureza conformacional, que limita a sua flexibilidade (Chong & Blank, 1998).

O seu comportamento em solução aquosa, portanto, é bem peculiar e a sua rigidez pode ser justificada, em parte, devido às ligações de hidrogênio entre os sacarídeos adjacentes, combinado com algum efeito de repulsão eletrostática mútua entre grupos carboxila (Hardingham, 2004). A solução de ácido hialurônico tem consistência gelatinosa, alta viscoelasticidade e alto grau de hidratação devido às características estruturais da molécula (Kim *et al.*, 1996). Scott (1989) foi um dos pesquisadores que demonstrou a capacidade de hidratação do AH, que pode atingir a relação de 100 vezes a sua massa em água.

O AH pode adotar diferentes conformações que são dependentes do nível de hidratação, do ambiente iônico e da temperatura. Soluções de AH apresentam propriedades viscoelásticas e seu comportamento não-ideal tem sido fonte de muito estudo.

Syang *et al.* (2008) estudaram as propriedades viscoelásticas de solução de HA em condições diversas, inclusive, adicionando albumina bovina na solução. Nesse estudo, descobriram que a viscosidade de HA diminui consideravelmente a partir dos seguintes fatores, nesta ordem: o aumento da concentração de sal > nível de pH > temperatura, sugerindo que esses fatores enfraquecem a atração intermolecular entre moléculas de HA. Por conseguinte, aumentar a liberdade da cadeia, sua extensão, e promover a formação de hélices sob cisalhamento, reduz o módulo de cisalhamento e

viscosidade de cisalhamento. O comportamento não-tixotrópico da solução de AH sugere que a degradação e recuperação da estrutura do AH devem proceder através dos mesmos estados intermediários, reafirmando o forte desempenho do AH como principal componente do líquido sinovial. Assim, Syang *et al.* (2008) chegaram à conclusão que albumina bovina (AB), em solução de AH, atua como lubrificante hidrodinâmico e de fronteira, melhorando substancialmente a habilidade da molécula de reter água.

As propriedades viscosas e elásticas dependem da estrutura primária e comprimento da cadeia molecular e sua conformação e operação de concentração (aglomeração). Isso porque a cadeia molecular do ácido hialurônico não é ramificada e é polianiônica, ela tende a ser estendida e um pouco rígida, ambas as características contribuem grandemente para suas propriedades elásticas. Devido a todas estas propriedades, esta molécula pertence à classe de polímeros chamados "super-líquidos elásticos", o que significa que eles possuem mais características elásticas. Assim, forças relativamente pequenas em função do seu impacto e frequência, podem causar uma deformação elástica muito maior neste líquido que em borracha líquida (Balazs, 2004).

AH, entre seus muitos papéis, é responsável por assegurar que os fluidos sinoviais permaneçam viscosos, densos e protetores, permitindo o crescimento da cartilagem. Devido à presença da Glicosamina, o ácido hialurônico também dá forma e volume ao corpo humano, mantendo-o literalmente unido (Revista de Oxidologia – Set/Out 1996).

Estudos demonstram que as funções biológicas do AH estão vinculadas à existência de inúmeras conformações e de interações específicas dessa molécula (Cowman *et al.*, 2005). É provável, que as conformações sejam afetadas pelo ambiente, assim como, pela ação de forças iônicas, interações específicas do íon, constante dielétrica local, efeitos

de exclusão de volume, exposição a forças mecânicas, e pela presença de substâncias que proporcionem uma interação.

Aproximadamente metade do AH presente no corpo humano ocorre na pele, sendo grande parte localizada no espaço intracelular onde pode alcançar concentração de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$. Além de servir como matriz em que as células estão embebidas, AH é capaz de imobilizar água nos tecidos, alterando o volume dérmico e sua compressibilidade, e influenciar a proliferação celular, a diferenciação e reparação de tecidos (Kogan *et al.*, 2007).

Em cartilagens, apesar de sua baixa concentração, AH funciona como importante elemento estrutural da matriz, formando um centro de agregação para um proteoglicano condroitina sulfato, que mantém sua estrutura macromolecular na matriz devido a interações específicas AH-proteína (Prehm, 2000).

Alguns órgãos possuem altas concentrações de ácido hialurônico, tais como o cordão umbilical, fluido sinovial e o humor vítreo. Na pele e em cartilagens, a sua função é ligar-se à água e reter a tonicidade e elasticidade dos tecidos. Nos fluidos das articulações, serve como lubrificante proporcionando um meio protetor para as células (Kim *al et.*, 1996).

2.1.3. Fontes do Ácido Hialurônico

Encontrado naturalmente nos tecidos conjuntivos de mamíferos, o ácido hialurônico pode ser extraído do fluido sinovial, pele, tendões e particularmente do corpo vítreo dos olhos, do cordão umbilical e também da crista de galo. O ácido hialurônico

disponível comercialmente é suprido prioritariamente pelas duas últimas fontes. No entanto, a obtenção do ácido puro a partir dessas fontes naturais apresenta duas grandes desvantagens: necessidade de purificação laboriosa, uma vez que esse produto encontra-se usualmente misturado com outros mucopolissacarídeos e proteínas, e redução da sua massa molar, devido à degradação das suas cadeias nos procedimentos complexos requeridos para a purificação (Ogrodowski, 2006).

Estudos mostram que o ácido hialurônico está presente na crista de galo em quantidades significativas. Os polissacarídeos isolados das cristas sem o epitélio consistem de ácido hialurônico e sulfato de condroitina na proporção 15:1. Em 1958, Balazs e Szirmai encontraram em polissacarídeos isolados da camada mucóide da crista quase que somente ácido hialurônico (Szirmai, 1956; Szirmai, 1961).

Entretanto, há restrições para a extração do AH para fins comerciais pelas vias citadas acima. Estas restrições são devido à redução da massa molar do AH após os processos de extração e purificação; à dificuldade na purificação do ácido, pois este está presente em tecidos animais e complexado com proteoglicanas; ao controle da massa molar; às questões éticas quanto à utilização de AH vindo de animais e também ao risco de contaminação viral. Assim, uma das maneiras mais viáveis para obtenção do AH é por via microbiana a partir de bactérias.

2.1.4. Aplicações do Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico (AH) não é imunogênico e, portanto possui um grande potencial de aplicações médicas e cosméticas nas áreas de oftalmologia, ortopedia,

implante de próteses, cicatrização de feridas, terapia de artrite, prevenção de adesão de tecidos em cirurgias, oncologia e dermatologia (Holmström & Ricici.,1967).

Este ácido tem sido aplicado em tratamentos e diagnósticos clínicos, devido à sua alta biocompatibilidade e o fato de exercer funções fisiológicas importantes, como por exemplo, lubrificação, difusão e transporte de proteínas, manutenção de água e eletrólitos, e aceleração de cicatrização de feridas (Swann & Kuo, 1991).

Devido às suas propriedades viscoelásticas, AH é usado em um grande número de cirurgias oftalmológicas. Preparações de AH são feitas para proteger os tecidos dos olhos delicados e proporcionar espaço durante a manipulação cirúrgica. Entretanto sua maior utilização encontra-se na substituição ou reposição de fluidos vítreos perdidos durante procedimentos como cirurgia de catarata ou implante de córneas (Kogan *et al.*, 2007).

O AH também tem tido bastante sucesso quando aplicado intra-articularmente para o tratamento de osteoporose. Greenberg *et al.* (2006) concluíram que terapias utilizando AH aumentam os efeitos benéficos contra a osteoartrite, restauram as propriedades viscosas e elásticas do fluido sinovial, estimulam o organismo a produzir mais AH pelas células e agem de maneira antiinflamatória e analgésica.

Devido a sua característica elástica, AH com ligações cruzadas também são utilizados para preencher rugas e cicatrizes profundas, fornecendo a elasticidade necessária para este preenchimento. Estudos comprovam o potencial de hidrogéis contendo AH como material para regeneração de tecidos. Shu *et al.*, (2004) descreveram o desenvolvimento destes hidrogéis, os quais não necessitam de implantação cirúrgica, sendo portanto injetados, e a melhoria na citocompatibilidade destes quando incorporados a fibroblastos.

Um novo produto, uma combinação de AH com dexpanotenol, vem sendo utilizado como hidratante e preparação tópica protetora e regeneradora da pele. Devido às suas

propriedades antioxidantes, AH atua como um componente antiinflamatório em materiais para recobrimento de ferimentos (Moseley, 2003).

Rosa (2008) comprovou forte atividade antioxidante do AH presente na crista de galo. Este AH tem a capacidade de sequestrar o radical DPPH demonstrando que o AH pode ser utilizado para proteger o corpo humano contra radicais livres e retardar muitas doenças crônicas. Também pode ser utilizado na indústria alimentícia como antioxidante natural.

No estudo da farmacologia, AH pode ser conjugado diretamente a outras drogas ou usado para preparar microcápsulas para liberação controlada de medicamentos (Esposito *et al.*, 2005), bem como pode ser usado para melhorar a biocompatibilidade de microesferas de quitosana utilizadas como cápsulas para liberação de drogas (Vasiliu *et al.*, 2005). Microesferas de AH são também utilizadas para liberação controlada de DNA plasmidial e anticorpos monoclonais na transferência de segmentação genes (Yun *et al.*, 2004).

2.2. Produção Microbiana de Ácido Hialurônico

2.2.1. Bactérias do Gênero *Streptococcus*

A produção de AH por *Streptococcus* é conhecida há 50 anos, e a maioria dos sistemas divulgados na literatura referem-se ao uso de *Streptococcus* do grupo *Lancefield* A e C, onde o grupo A é considerado como patógeno humano e o grupo C, patógeno de animais. *Streptococcus* do grupo *Lancefield* A e C são β - hemolíticos por exibirem β - hemólise pela estreptolisina do cultivado em placas de ágar sangue. Embora a

correlação entre a capacidade de produção da estreptolisina e a patogenicidade do microrganismo não seja claramente entendida, AH para aplicações médicas ou cosméticas não pode estar contaminado com essa proteína. Entretanto, dificilmente consegue-se produzir AH efetivamente não contaminado com estreptolisina (Thonard *et al.*, 1963; Holmstron e Ricici, 1967; Woolcock, 1974; Pires, 2009).

O uso de bactérias para a produção do AH tem sido defendido por várias razões técnicas, econômicas e éticas. A produção do ácido por via microbiana, a partir de bactérias gram-positivas tais como *Streptococcus*, mostra a formação de uma cápsula mucóide de polissacarídeos, como produto extracelular, ao redor destas. A síntese de AH como principal polissacarídeo capsular nesses patógenos é um fator biocompatível, que permite a estas bactérias gram-positivas evadir as defesas do organismo, proteger-se contra fagocitoses, e, conseqüentemente, causar alto nível de virulência (Roberts *et al.*, 1989). A formação da cápsula mucóide pode ser vista na Figura 2.3.

O AH produzido por *Strotococcus* é não imunogênico, ou seja, é quimicamente idêntico ao produzido por mamíferos e, por isso, é um dos meios de produção mais estudados atualmente.

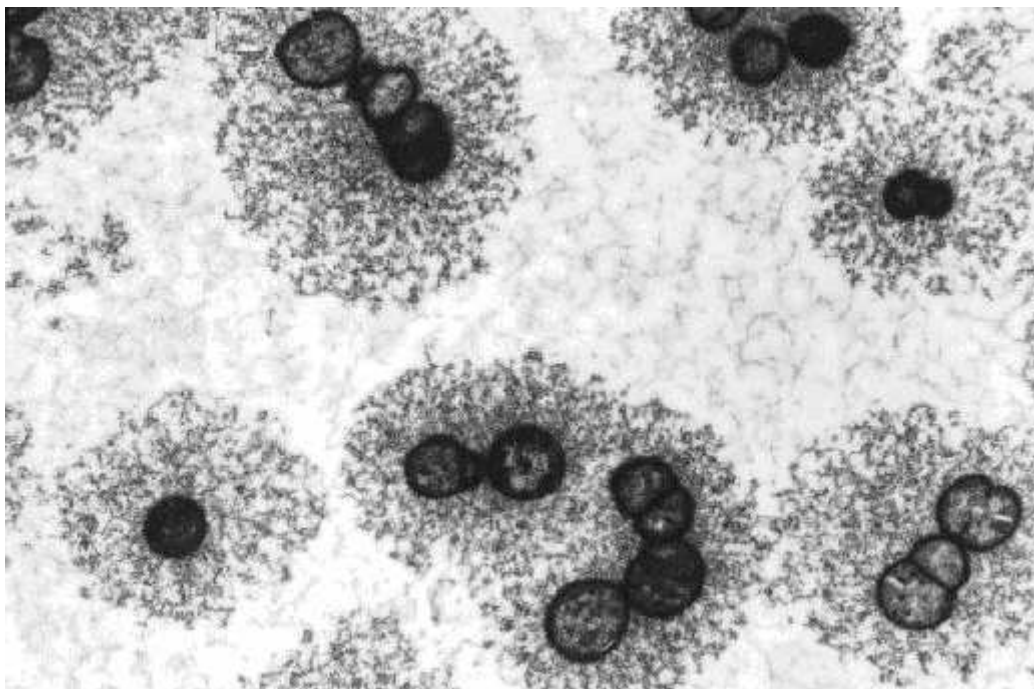


Figura 3 - Células de *Streptococcus zooepidemicus* (bactéria gram-positiva) com suas cápsulas de ácido hialurônico em meio aerado (Chong & Blank, 1998; Ogradowski, 2006).

O processo de preparação do AH produzido por microrganismo vem sendo desenvolvido para atuar em escala comercial (Holmstrom and Ricica, 1967; Markovitz *et al.*, 1959), entretanto, é muito importante que o AH produzido seja livre de streptolisina como foi explicado anteriormente. Kim *et al.* (1996) estudaram a produção de AH com alta massa molar utilizando *Streptococcus* ATCC 6580 mudado geneticamente o qual não produzia streptolisina e enzimas que prejudicam a obtenção do produto.

2.2.2. Metabolismo do *Streptococcus*

Streptococcus são bactérias lácticas homofermentativas, nutricionalmente fastidiosas, que requerem meio de cultivo rico para crescimento. Sob condições anaeróbias, o principal produto fermentativo derivado do catabolismo de glicose é o ácido láctico, com baixos níveis de formato, acetato e etanol. A glicose é principalmente metabolizada em ácido láctico e ácido acético por reações de oxidação do ácido pirúvico (Sedewitz *et al.* 1984). AH é sintetizado através da polimerização de UDPN-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) e UDP-glicurônico (ácido UDP-GlcA) catalisada pela sintase. O esqueleto glicosil de ácido hialurônico vem da glicose (Dorfman, 1955). A glicose é convertida em frutose-6-fosfato através da EMP, em seguida, para glucosamina-6-fosfato e, finalmente, a UDP-GlcNAc. A glicose também pode ser metabolizada em UDP-GlcA em via metabólica do ácido glucurônico (Dougherty & van de Rijn, 1994; De Luca *et al.*, 1995). O fluxo metabólico de *S. zooepidemicus* para a síntese de AH é ilustrado na Figura 4.

Gao *et al.* (2005) construíram uma rede de fluxos para o metabolismo do *S. zooepidemicus*. Estas reações foram estimadas pelo Análise de Fluxos Metabólicos (MFA) com taxas de acúmulo de biomassa e de produto, taxa de consumo de glicose, utilizando fermentação em batelada e controlando o oxigênio dissolvido. As alterações dos fluxos foram observadas em diferentes estágios da fermentação em batelada e em diferentes taxas de oxigênio dissolvido (TOD) controladas durante o processo de fermentação. Os resultados desse estudo mostraram que a alta concentração de glicose no meio não afetou a distribuição do fluxo metabólico, e também não influenciou a taxa de absorção de glicose, podendo ser concluído que a síntese de AH foi influenciada pelo TOD. O trifosfato de

adenosina (ATP) e a nicotinamida adenina (NADH) produzidos no processo de fermentação estão associados com o crescimento celular e a síntese de AH.

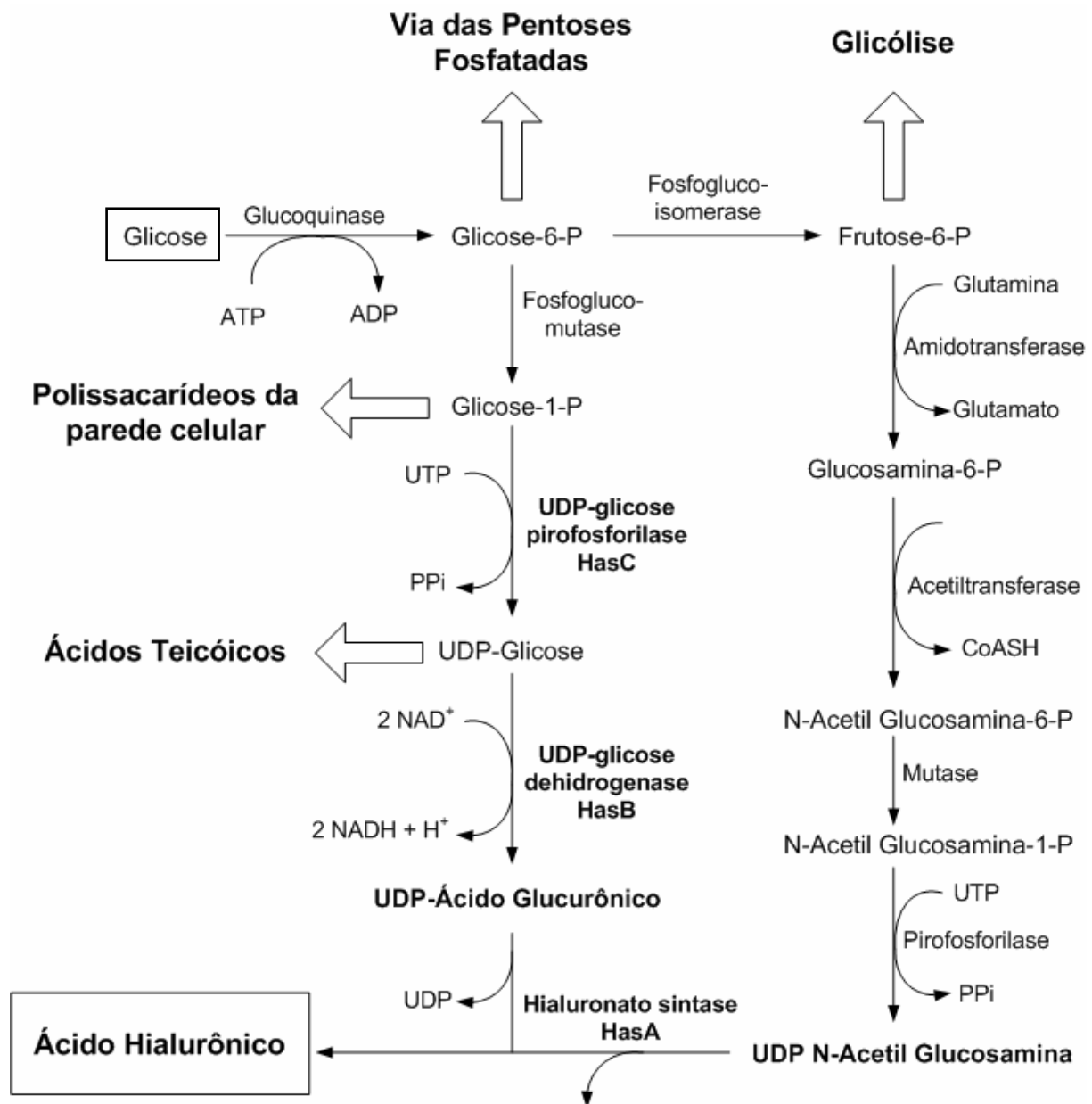


Figura 4 - Via biossintética para produção de ácido hialurônico por *Streptococcus* (Chong *et al.*, 2005; Adaptado por Pires, 2009).

A biossíntese do polímero é dispendiosa para o microrganismo com relação ao consumo de energia e de carbono. Um total de 4 moles de ATP são consumidos para produzir 1 mol da unidade dissacarídica de AH, sendo 2 moles consumidos nas duas reações glicoquinase para fornecer as hexoses precursoras fosforiladas para cada ramificação da via biossintética, e os outros 2 moles de ATP utilizados para regenerar os doadores UDP. A reação de oxidação catalisada pela UDP - glicose desidrogenase gera 2 moles de NADH para cada 1 mol de AH sintetizado.

Além de fornecer os precursores para a síntese de AH, essas duas vias fornecem também constituintes estruturais da parede celular bacteriana, como peptidoglicano e ácidos teicóicos. Armstrong (1997) observou uma relação negativa entre a velocidade de crescimento e a produtividade específica de AH e sua massa molar. Mas, essa relação negativa ocorre somente quando a inibição do crescimento não está associada com assimilação reduzida de glicose. Quando as condições tornam-se suficientemente severas para inibir o consumo de glicose, primeiro a produtividade e, em seguida, a massa molar diminuem. Esse comportamento indica que a produção de AH compete por fontes limitadas com a síntese de massa celular. Quando for possível reduzir a demanda de massa celular, sem reduzir o fornecimento de nutrientes, maior a quantidade de AH e maior será a massa molar produzida (Pires, 2009).

Baseando-se na similaridade entre os tempos de produção de uma cadeia de AH e o período de meia vida da hialuronidase sintase (2 a 4 horas), se proposto que a mesma produza apenas uma cadeia do ácido. A hialuronidase sintase não aumentará a massa molar do AH sintetizado, mas poderá reduzir a massa molecular média em caso de competição (Chong, 1998).

Assim, como a capacidade de polimerização da hialuronidase sintase, pH e temperatura também são fatores muito importantes e críticos que afetam a produção e a massa molar do ácido hialurônico. Observou-se que há uma diminuição significativa do peso molecular de HA em temperaturas inferiores a 37°C, e que o controle do pH em torno de 7,0 torna a célula mais ativa em relação ao seu crescimento, permitindo maior produção de ácido hialurônico, com moléculas possuindo máxima massa molar (Kim *et al.*, 1996).

Em outras condições de pH, tanto a produção de ácido hialurônico quanto sua massa molar diminuiriam significativamente. Além disso, parece possível obter ácido hialurônico com massas molares diferentes, controlando parâmetros experimentais como pH, temperatura e agitação. Algumas estratégias podem ser empregadas com o intuito de aumentar a massa molar do AH obtido, dentre elas estão o aumento do tempo de vida da hialuronidase sintase, a diminuição da taxa de síntese de biomassa, para reduzir a competição pelas fontes de carbono e nitrogênio, e aumento do fluxo. Esta discussão conduz a um levantamento de várias estratégias para aumentar a competição pelas fontes de carbono e nitrogênio, aumentando o fluxo dessas fontes para síntese de AH e disponibilizando a energia eficiente da célula (Chong e Blank, 1998; Pires, 2009).

2.2.3. Meios de Cultura

2.2.3.1. Meios Empregados

Streptococcus dos Grupos A e C possuem exigências nutricionais com relação ao nitrogênio orgânico (Bio - Tecnologia General Corporation, 1986; Denki

Kagaku Kogyo KK, 1993). Geralmente, no meio utilizado é colocado extrato de levedura, peptonas ou hidrolisado de caseína como fonte de nitrogênio, e fatores de crescimento, bem como magnésio e sais fosfato. As fontes de nitrogênio orgânico são consideradas essenciais para o bom crescimento de *Streptococcus*, pois não há evidências de que esses componentes também forneçam uma grande quantidade de carbono para a biossíntese celular (Khieokhachee, 1994; O'Regan *et al.*, 1994).

Até agora, não há trabalhos detalhados sobre os requisitos nutricionais do *Streptococci* do grupo C, nem dos Meios Quimicamente Definidos (MQD) para seu cultivo. No entanto, o MQD tem sido relatado para o grupo A (van de Rijn e Kessler, 1980), o grupo B (Milligan *et al.*, 1978) e o grupo de bactérias de *Streptococcus* que vivem na boca (oral) (Terleckyj *et al.*, 1975). Estes MQD são todos complementados com várias vitaminas e os requisitos de nitrogênio orgânico são atingidos pela adição de aminoácidos. A capacidade de *Streptococcus* para sintetizar aminoácidos é variável e dependente das condições de crescimento.

Milligan *et al.* (1978) identificaram 12 aminoácidos essenciais para o crescimento de 16 cepas de estreptococos do grupo B, nas condições aeróbia e anaeróbia. No entanto, a remoção de 3 aminoácidos “não essenciais” de um MQD para *Streptococcus agalactiae*, um streptococcus do grupo B, levou a uma taxa de crescimento e rendimento baixos das células (Willet e Morse, 1967). Diferentes cepas de *Streptococcus* orais tiveram várias exigências de aminoácidos essenciais, e precisavam de uma gama mais ampla em condições aeróbias (Terleckyj e Shockman, 1975). A identidade de aminoácidos essenciais para os grupos A e C de *streptococci* permanece desconhecido.

Armstrong & Johns (1997) avaliaram os requerimentos nutricionais para o crescimento e a síntese do ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* (Grupo C). Um MQD foi desenvolvido para o cultivo do *Streptococcus zooepidemicus* em condições anaeróbias, o qual continha apenas 11 aminoácidos, essenciais ao crescimento, e a glutamina como a principal fonte de nitrogênio. Neste trabalho verificou-se que a taxa máxima de crescimento específico e produtividade volumétrica de AH (g/L.h) foi menor no MQD quando comparada ao meio complexo. Entretanto, a taxa de produção específica e a concentração final de AH (g/L) foram comparáveis nos dois meios. A massa molar média do AH produzido no MQD (2600 ± 100 kDa) foi maior que no meio complexo (2200 ± 100 kDa). Apesar das diferenças observadas, a produção do AH no MQD foi considerada promissora.

Amstrong *et al.* (2008) ainda estudaram alguns componentes do meio MQD para *Streptococcus zooepidemicus* do grupo C e chegaram à conclusão de que a suplementação do MQD com citrato de sódio e bicarbonato de sódio foi benéfica. Ambos causaram um aumento do crescimento do microorganismo. O papel do citrato de sódio é incerto, embora o envolvimento em quelação de íons metálicos foi proposto (Terleckyj *et al.*, 1975). O efeito do bicarbonato de sódio está provavelmente relacionado com a manutenção de concentrações de CO₂ adequada no meio de crescimento. Gás carbônico não é produzido por *S. zooepidemicus* durante fermentação em batelada, mas pode desempenhar um papel importante na conversão de fosfoenolpiruvato a oxaloacetato, que envolve o consumo de CO₂.

Os custos de produção microbiana são muito influenciados pelo preço dos meios de cultura, principalmente pelas fontes de proteína, e o uso de caldos com peptonas

comerciais não são econômicos, devido ao seu uso em grande quantidade. No entanto, esses custos poderiam ser reduzidos utilizando-se materiais residuais. Vázquez *et al.*, (2009) utilizaram peptonas marinhas de subprodutos de peixe como nutrientes nas formulações de meios, e observaram que estas proporcionaram excelentes resultados em diferentes produções biotecnológicas, principalmente na produção de AH.

Seguindo a linha de utilização de novos meios para fermentação de AH, Macedo (2007) utilizou suco de caju *in natura* e clarificado como substrato. As amostras de AH produzidas a partir de suco clarificado em relação ao AH produzido a partir do suco *in natura* apresentaram um maior percentual de moléculas com massa molar na ordem de 10^3 , mostrando que os estudos com novas alternativas de substrato para produção de AH estão tendo ótimos resultados.

2.2.3.2. Meio Suplementado com Água de Maceração de Milho

Estudos para a otimização de variáveis dos processos fermentativos utilizando resíduos e subprodutos agroindustriais, com objetivo de baixar os custos da matéria prima e de produção, sem prejuízo da qualidade do produto final, são bem estimulados. Desse modo, desenvolver processos que valorizem e agreguem valor aos produtos agrícolas produzidos no Brasil e aos resíduos por eles gerados é uma ação muito importante (Damasceno *et al.*, 2003; Impactos, 2006).

Atualmente, existem muitas oportunidades para o estabelecimento de atividades voltadas ao beneficiamento e/ou reprocessamento de bioresíduos, entre os quais podemos citar, por exemplo, bagaço de cana e de mandioca, palha de cereais, bagaço de

laranja, água de maceração de milho, serragem hidrolisada de madeira ou de outros resíduos de atividades florestais. Todos esses materiais são ricos em substâncias de elevado valor energético como a celulose, as hemiceluloses, a lignina, óleos essenciais e extrativos, amido, além de açúcares diretamente fermentescíveis (Woiciechowski, 2001).

Trabalhos recentes mostram a utilização de meios agroindustriais para a produção de ácido láctico a partir de recursos agrícolas tais como cevada, trigo e farinha de milho, sem qualquer suplementação, sendo o processo realizado em biorreator de escala laboratorial, a fim de investigar a possibilidade de utilização dessas matérias-primas como uma única fonte de nutrientes (Ferreira, 2006).

A água de maceração de milho é um subproduto do processamento dos grãos de milho obtido durante a lavagem e embebição dos grãos quando há o fracionamento destes em amido e germe (óleo). Os grãos de amido solúveis são liberados e submetidos a uma suave fermentação láctica por bactérias dos próprios grãos de milho, resultando em uma solução concentrada que contém em sua composição química carboidratos solúveis, aminoácidos e sais minerais. Está é utilizada principalmente na alimentação de ruminantes, galinhas e em processos fermentativos, por ser fonte dos principais aminoácidos e nutrientes necessários a várias espécies de microrganismos (Ferreira, 2006).

A água de maceração de milho (“Corn Steep Liquor” – CSL) foi utilizada como fonte de nitrogênio para produção de ácido láctico por *Enterococcus faecalis*, onde o meio CSL foi suplementado com hidrolisado de farinha de trigo integral (Oh *et al.*, 2005). A concentração celular de *E. faecalis* RKY1 aumentou com a suplementação de CSL até 10 g/L, mas não houve melhora significativa na concentração de células além desse valor. A produtividade de ácido láctico também foi aumentada de 1,21 g/L.h para 4,14 g/L.h com a

adição do hidrolisado de farinha de trigo ao meio CSL, de 0 g/L a 25 g/L. Embora a utilização do meio CSL com a complementação da farinha de trigo não tenha sido tão vantajosa para o crescimento celular durante a fermentação, os efeitos foram benéficos sobre a utilização da glicose, que melhorou bastante a produção de ácido lático.

Quando 1,5 g/L de extrato de levedura foi adicionada no meio contendo 200 g de hidrolisado/L de farinha de trigo e 15 g/L de CSL, a produtividade de ácido lático obtido foi 41% superior ao da fermentação do ácido lático utilizando hidrolisado de farinha de trigo sem extrato de levedura. Estes resultados mostram que essa combinação pode aumentar significativamente a produção de ácido lático utilizando meios baratos (Oh *et al.*, 2008).

A água de maceração de milho é uma excelente fonte de nitrogênio para a maioria dos microrganismos, por ser rica em aminoácidos e polipeptídeos com quantidades consideráveis de vitaminas do complexo B (Cardinal *et al.*, 1948), além de ser uma fonte de baixo custo. Yu *et al.*, (2007) estudaram o efeito da CSL junto com a glicose, melão, Tween80 e $MnSO_4$, em fermentação de ácido lático por *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. Água de maceração de milho foi adicionada, como uma única fonte de nitrogênio, em cooperação com outros componentes para substituir extrato de levedura, buscando a produção mais econômica de ácido lático. Verificou-se que a produção de ácido lático alcançou um máximo de 113,05 g/L quando a concentração ideal de glicose, melão, milhocina, Tween80 e $MnSO_4$ foram 118,20 g/L, 37,27 ml/L, 42,54 g/L, 1,52 ml/L e 0,30 g/L, respectivamente. Assim, comparando com a produção de ácido lático no meio com extrato de levedura como única fonte de nitrogênio, a produção de ácido lático no meio otimizado aumentou em 30,4%.

O meio contendo CSL também tem sido utilizado para a produção de enzimas como, por exemplo, na produção de Glicose oxidase (β -glicose; 1 oxigênio oxidoreductase), uma enzima importante, que tem inúmeras aplicações na indústria de alimentos e campos clínicos (Buck e Richter, 1983). O microrganismo *A. niger* foi isolado e produziu 500 ± 35 unidades/ml de enzima glicose oxidase e com meio contendo apenas sacarose (60 g/L). O uso da CSL resultou produção de 640 ± 36 unidades/ml de glicose oxidase, melhorando sua produção (Kona *et al.*, 2001).

Mesmo com ótimos resultados da utilização de CSL nas produções biotecnológicas, não se tem muitos estudos na literatura do uso desse meio para a produção do HA.

Recursos agrícolas derivados, tais como a proteína de soja hidrolisada concentrada (HSPC), concentrado protéico de soro (WPC), e suco de caju (CAJ) foram estudados para a produção de ácido hialurônico (AH) por *Streptococcus zooepidemicus*. Pires *et al.*, (2009) avaliaram a utilização de derivados agroindustriais como fonte de nitrogênio orgânico para produção microbiana de AH, como por exemplo, a suplementação do meio com milhocina (CSL). A CSL foi usada apenas como um complemento (10% v/v), devido a sua baixa concentração de nitrogênio total (0,07% p/v). Além disso, a CSL também contém apreciáveis quantidades de vitamina B e nutrientes minerais valiosos, como cálcio, magnésio, fósforo, potássio e ferro (Liggett e Koffler, 1948).

Os dados obtidos por Pires *et al.*, (2009) comparam o desempenho das fermentações em termos de crescimento celular, produção de HA, coeficiente de rendimento de HA em relação à glicose e à massa molar média do HA produzido.

O concentrado protéico de soro e proteína hidrolisada de soja concentrada foram igualmente eficazes na produção de AH, porém, concentrações mais baixas foram obtidas se comparado ao controle. Em todos os casos, a produção de AH foi independente da suplementação com água de maceração de milho, e quanto maior o crescimento celular, menor foi a produção de AH. O último comportamento está em conformidade com a relação inversa entre a taxa de crescimento específico e produtividade de AH descrito por Armstrong (1997). A maior produção de AH foi obtida a partir do suco de cajú, mas para ter um bom resultado, foi necessária suplementação do meio com extrato de levedura. A suplementação com água de maceração de milho não influenciou a produção de AH em vários meios. No entanto, ele teve influência sobre o consumo de glicose, duplicando o coeficiente de rendimento de glicose para o meio de controle e reduzindo-o para o meio com suco de cajú.

2.3. Condições de Operação do Processo Fermentativo

O efeito de vários parâmetros da fermentação na massa molar do AH produzido por *Streptococcus zooepidemicus* foram analisados em diferentes estudos, podendo-se destacar os fatores mais significativos na produção de AH de alta massa molar como sendo a temperatura (37°C), a aeração do meio e a alta concentração de glicose (40 g/L). Entretanto, fatores como o pH e a agitação não influenciam o tamanho da massa molar, mas o seu controle é fundamental para o aumento da produtividade do processo. A seguir, estes fatores serão descritos de forma mais detalhada.

2.3.1. Temperatura

No decorrer do processo de fermentação, a temperatura é um dos parâmetros que deve receber maior atenção, pois é um fator que influencia tanto o crescimento celular como a formação do produto fermentativo. Contudo, as temperaturas ótimas para crescimento e formação de produto podem ser diferentes (Shuler e Kargi, 2002).

Em estudos de duas linhagens do microrganismo *Streptococcus*, a temperatura ótima para o crescimento e para maior formação de AH por bactérias lácticas foi determinada. Esta temperatura ótima para a linhagem mutante de *Streptococcus equi* foi encontrada em torno de 37°C, havendo uma redução na massa molar do AH produzido em temperaturas inferiores (Kim *et al.*, 1996). Entretanto, outros dados são reportados na literatura mostrando que a temperatura na qual se consegue maior velocidade específica de crescimento para o *Streptococcus equi* foi a de 40°C e, que em menores temperaturas (entre 32 e 35°C), houve um aumento no rendimento da produção e massa molar de AH. Os autores Armstrong e Johns (1997) sugerem que este efeito está relacionado à redução da velocidade específica de crescimento com a diminuição da temperatura e à competição por fontes de substrato e energia entre as vias catabólicas, anabólicas e de síntese de AH que existe durante a fase exponencial de crescimento.

Para a linhagem *Streptococcus zooepidemicus*, Chong e Blank (1998) analisaram o efeito de vários parâmetros da fermentação na massa molar de HA produzido e, dentre outros resultados, puderam determinar que a temperatura ótima para a produção de AH de alta massa molar está abaixo de 28°C.

2.3.2. Potencial Hidrogeniônico

O controle do pH do meio de cultivo utilizado durante o processo fermentativo é de grande importância para o aumento da produtividade de AH, devido a influência exercida na atividade enzimática e, portanto, na velocidade de crescimento celular. Embora o pH exerça uma influência considerável na taxa de produção e rendimento do biopolímero, foi observada pouca influência na massa molar do AH produzido.

Estudos determinaram a temperatura ideal para que a enzima hialuronato sintase, a qual catalisa a polimerização de AH, apresente atividade máxima. Extratos livres de células obtidos de streptococci do grupo A de Lancefield mostraram atividade máxima em pH 7,1 (Stoolmiller e Dorfman, 1969). Já em trabalhos com hialuronato sintase extraída de células de *Streptococcus equisimilis*, a atividade máxima foi encontrada para uma faixa de pH mais ampla, em torno de 6,5 e 11,5 (Tlapak-Simmons *et al.*, 2004)

Diferentes autores avaliaram o efeito do pH no cultivo de streptococci. Akasaka *et al.* (1988) demonstraram que pH 7,4 resulta AH de maior viscosidade. Johns *et al.* (1994) observaram que o pH ótimo para a produção de AH em cultivo em batelada foi de $6,7 \pm 0,2$. Adicionalmente, Liu *et al.* (2008) investigaram uma estratégia de cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* sob stress alcalino intermitente (8,5), que aumentou a produção de HA por meio do redirecionamento do fluxo de carbono de massa celular para o AH.

Os efeitos do controle do pH do meio de cultura no metabolismo celular de *Streptococcus zooepidemicus* foram estudados sob condição de manutenção do pH constante (7,0) e em condição acidificante, ou seja, sem a constante manutenção do pH

(Pires *et al.*, 2009). Resultados mostram que o controle do pH ao longo do cultivo apresentou além de uma maior produtividade celular ($0,21 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), uma maior produtividade de AH ($0,10 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), com total consumo de glicose como fonte de carbono. No entanto, no cultivo acidificante uma inversão da direção da fonte de carbono para a síntese de AH à custa do crescimento celular foi observada. Embora os benefícios mencionados, o massa molar média de AH produzido em pH constante foi de $4,0 \times 10^6$ Da, inferior ao obtido sob condições de acidificação, que foi de $2,1 \times 10^7$ Da (Pires *et al.*, 2009).

Os resultados de Pires *et al.*, (2009) mostram ainda que, em ambos os casos estudados, a fase exponencial ocorre ao longo das primeiras 6h. A quantidade de glicose presente no meio foi totalmente consumida apenas para o caso de pH controlado, e também para esta condição, obteve-se a maior produção de AH, sendo quase duas vezes maior do que para a condição de pH acidificante. Para o cultivo com pH não controlado, o meio teve seu valor de pH drasticamente reduzido a aproximadamente 5,0, conforme o esperado para um cultivo de bactéria láctica.

2.3.3. Agitação e Aeração

Agitação e aeração são fatores importantes em processos aeróbios e têm efeito significativo no rendimento da maioria dos biopolímeros (Richard e Margaritis, 2003).

O processo fermentativo visando à obtenção de ácido hialurônico pode ocorrer sob condições anaeróbias ou aeróbias, entretanto a aeração pode melhorar o seu rendimento, bem como resultar AH de maior massa molar. O AH obtido em condições

aeróbias possui massa molar média de 2×10^6 Da, contra massa molar de 7×10^5 Da ou menor resultante de condições sem oxigênio (Akasaka *et al.*, 1988).

Streptococcus são microrganismos anaeróbios facultativos, que crescem bem em ambas as culturas aeróbicas e anaeróbias. A função do oxigênio na produção de AH ainda não está bem esclarecida, acredita-se que o papel do oxigênio na síntese de AH não é de substrato, mas como de estimulante. Como a formação do ácido hialurônico ocorre na forma de uma película ao redor do microrganismo, sugere-se que AH funcione como uma proteção impermeável aos efeitos tóxicos do oxigênio, sendo a sua produção então estimulada como um mecanismo protetor das células (Huang *et al.*, 2006).

Além disso, *Streptococcus* é um microrganismo homofermentativo em meios de baixa ou alta concentração de oxigênio, apresentando como produto final de seu metabolismo ácido L-lático e ácido acético, respectivamente. Já em concentrações intermediárias de oxigênio, *Streptococcus* é heterofermentativo, produzindo os ácidos L-lático e o ácido acético, com predominância do primeiro (Swann *et al.*, 1990). Uma consequência do mecanismo desviado para a produção do ácido acético é o aumento no crescimento celular em detrimento da produção de ácido hialurônico. Entretanto, diminuindo a concentração de oxigênio em uma etapa crítica da fase exponencial de crescimento das células, o microrganismo responde com maiores taxas de produção de AH. O nível crítico de oxigênio dissolvido para a produção de HA foi determinado em 5% da saturação (Huang *et al.*, 2006).

A biossíntese do ácido hialurônico é um processo dispendioso de energia, assim, o maior rendimento em ATP sob condições aeróbias pode explicar o melhor rendimento e grau de polimerização de AH. Estudos demonstraram que a aeração de culturas de *Streptococcus zooepidemicus* conduziu a um maior rendimento de AH e de

maior massa molar. Sob condições aeróbias, acetato foi produzido a partir de piruvato, o que conduz a uma regeneração de 1 mol de ATP por mol de glicose consumido, comparado com a produção de lactato (Armstrong e Johns, 1997). Ademais, alguns trabalhos sugerem que condições anaeróbias podem aumentar a degradação de AH por radicais livres derivados do oxigênio, o que conduziria a uma redução da massa molar e alargamento da distribuição da massa molar.

O efeito da agitação ainda não foi completamente esclarecido, sendo descrita a necessidade de agitação vigorosa para melhorar a transferência de massa e de oxigênio do meio. Em níveis variados de agitação, variando entre 300 e 1000 rpm, a massa molar de AH produzido por *Streptococcus zooepidemicus* não foi afetada, o que sugere que as moléculas de AH são relativamente resistentes a forças cisalhantes do agitador, podendo então ser empregada alta agitação sem danificar as moléculas do biopolímero (Armstrong e Johns, 1997). Porém, em trabalho recente realizado em reator do tipo Bioflo III, foi mostrado que para menores níveis de agitação as fermentações são mais controladas quando comparadas a níveis elevados (por exemplo, 400 rpm), e que estes podem acarretar o cisalhamento da célula (Ogrodowski, 2006).

Um fator que afeta a aeração e a agitação da mistura em fermentação e, portanto, deve ser levado em consideração, é a viscosidade da cultura e de seus produtos. Ogrodowski (2006) apresentou a influência do tipo de aeração na viscosidade do AH produzido, relacionando dados obtidos através das curvas de viscosidade do AH produzido em cultivo com aeração forçada de 2,0 vvm, em comparação com o AH obtido com aeração natural e o AH padrão.

O excesso de oxigênio resultante da aeração forçada (2,0 vvm) durante a fermentação aumentou a produção de AH para 3,75 g/L, quando comparada com a

produção de AH em frascos de Erlenmeyer (aeração natural) 3,29 g/L. No entanto, não há evidências se o AH aumenta com a concentração de oxigênio devido à maior formação de ATP ou células, ou devido ao estresse causado no microrganismo, uma vez que os *Streptococcus* são anaeróbios facultativos.

Ainda, o AH produzido sob condições de aeração forçada apresentou viscosidade 913 cP, módulo elástico 73,1 Pa e massa molar $3,2 \times 10^6$ Da. O corte na alimentação de oxigênio causou despolimerização reduzindo a viscosidade e a viscoelasticidade do AH. Em seus resultados, Ogrodwski (2006) obteve as curvas de viscosidade para o ácido hialurônico sob diferentes condições de aeração apresentam o mesmo comportamento reológico, porém o AH produzido com aeração forçada é mais viscoso que o obtido com aeração natural, até mesmo em relação ao padrão.

Assim, pode ser observado que as condições ideais para a produção de AH, com as características viscosas e viscoelásticas necessárias para as aplicações pretendidas, foram níveis baixos de agitação (150 rpm) e fornecimento de oxigênio à célula, através de aeração contínua (2,0 vvm).

No entanto, Ransgaswamy e Jain (2007) estudaram a influência das fontes de carbono e da composição do meio na massa molar do AH e para o processo fermentativo, utilizaram 400 rpm de agitação no reator e 2,0 vvm de aeração. A combinação desses fatores (composição do meio, aeração e agitação) levou a uma produção de moléculas de AH de alta massa molar, de grau médico e ainda conseguiram uma concentração de 5 – 6 g/L de AH no final do processo fermentativo.

2.4. Estratégias para Aumentar a Produção de Ácido Hialurônico no Processo Fermentativo

2.4.1. Estratégia do Choque Ácido em Bactérias Lácticas

O tratamento ácido vem sendo usado como estratégia para o desempenho e a robustez do crescimento de bactérias lácticas. Esses microrganismos devem resistir às condições adversas encontradas nos processos industriais, como por exemplo, durante o manuseio e armazenagem (liofilização, congelamento ou “spray-drying”). O desenvolvimento de novas aplicações, tais como vacinas e alimentos probióticos, reforça a necessidade de bactérias robustas que possam sobreviver no trato digestivo, resistir à flora intestinal e expressar funções específicas em condições que são desfavoráveis ao crescimento, como por exemplo, durante a fase estacionária ou armazenagem.

Como em outras bactérias, respostas adaptativas parecem ser um modo habitual de proteção ao estresse nas bactérias lácticas, mas o modo como ocorre pode variar entre as espécies. Esta observação sugere que as bases moleculares de adaptação às respostas são pelo menos em parte, específicas para cada uma das espécies (ou mesmo subespécies).

Os efeitos do tratamento ácido sobre a fisiologia bacteriana ainda não são conhecidos em detalhe. Inicialmente, sabe-se que BAL são neutrófilas, ou seja, são bactérias que possuem pH ótimo para o crescimento entre 5 e 9, com exceção de algumas espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus*. Além disso, já é de conhecimento que ácidos podem difundir passivamente através da membrana celular e

depois adentrar para o citoplasma rapidamente, e dissociar-se em prótons e cargas derivadas que são impermeáveis na membrana celular (Presser *et al.*, 1997). Em BAL, a tolerância a ácidos (TA) aumenta em pelo menos dois diferentes estados fisiológicos: primeiro durante o crescimento logarítmico de uma resposta adaptativa denominada L-RTA, que pode ser induzida pela incubação em um pH ácido não-letal, e segundo, após a entrada em fase estacionária, TA aumenta, como resultado da indução de um estresse geral de resposta (Hartke *et al.*, 1996).

Muitos estudos proteômicos realizados em bactérias lácticas para o desenvolvimento de tolerância ao tratamento ácido mostram que inúmeras proteínas são induzidas durante a adaptação ácida nessas bactérias (Champomier – Verges *et al.*, 2002). Ao todo, análises bioquímicas, proteômicas e genéticas indicam que as respostas ao tratamento ácido em BL são processos intrincados que envolvem a síntese de uma variedade de proteínas e severos mecanismos (Serror *et al.*, 2002).

Sá – Correia *et al.* (1998) estudaram a indução da termotolerância em células de *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 pré-expostas a um suave tratamento ácido com HCl em pH 3,5 durante 10 min na presença de glicose. Examinaram o efeito sobre a termotolerância da levedura durante o pré-condicionamento por incubação rápida de células a pH baixo, com a presença ou ausência de glicose (0,1 M), usando como acidulantes o ácido clorídrico em valores de pH de 6,5-2,0 ou ácido acético em pH 3,5. A queda na concentração da glicose, ou outros nutrientes, induz uma resposta à essa condição de concentração limitante de glicose para o microorganismo. Isso faz parte da resposta ao estresse e torna as células resistentes a diferentes condições de estresse (de Winde *et al.*, 1997; Mager e Hohmann, 1997 e SIDERIUS e Mager, 1997).

Foram analisados os resultados da termotolerância em *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 em relação ao jejum de glicose e choque ácido e essas duas análises foram comparadas. Os microorganismos foram avaliados através da comparação da perda de viabilidade, a 47 °C, de células pré-incubadas durante 10 min, em diferentes meios de cultura.

Tabela 1- Efeitos do tratamento pré-condicionado de *S. Cerevisiae* YPH499, na ausência de glicose e acidificação do meio externo utilizando ácido acético ou HCl como acidulante, sobre a taxa de mortalidade de levedura específica (k_d), a 47 °C e em pH citosólico (PHC).

Pré - Tratamento das células			k_d (h ⁻¹)	pH _c
[Glucose] (M)	pH	Acidulante		
0.1	6.5	—	5.1	7.1
	3.5	Acetic acid	5.0	5.4
	3.5	HCl	3.6	6.9
	2.5	HCl	4.9	na
	2.0	HCl	5.0	na
0	6.5	—	3.0	6.6
	3.5	Acetic acid	3.4	5.2
	3.5	HCl	2.9	6.2
	2.5	HCl	2.8	na
	2.0	HCl	3.4	na

Valores do pH citosólico depois dos vários pré - tratamentos estimados por Carmelo et al. (1997) usando células e condições de incubação idênticas.
na, resultados não avaliados.

Depois que as células de levedura foram cultivadas a 30°C até o fim da fase exponencial, estas foram transferidas e mantidas (pré-condicionadas) em meio com glicose e tamponado (MES-TRIS), a pH 3,5 (ajustado com um ácido forte, HCl). Neste caso, a perda de viabilidade a 47 °C foi significativamente mais lenta do que quando essas mesmas células foram pré-condicionadas em pH 6,5. A redução do meio de incubação de pH abaixo de 2,5 ou 2,0 (também ajustado com HCl) não obteve, aparentemente, nenhum efeito sobre a termotolerância da levedura.

Quando ácido acético (50 mM) foi utilizado em vez do HCl para acidificar o meio para pré-condicionamento em pH 3,5, a aquisição de termotolerância demonstrada, quando se utiliza um ácido forte como acidulante, não foi mais observada. Quando a glicose estava ausente no meio pré-condicionamento, a termotolerância de *S. cerevisiae* YPH499 estava acima dos valores estimados, se comparado quando a glicose estava presente, independentemente do pH do meio. Estes resultados sugerem que os mecanismos subjacentes à aquisição de termotolerância em resposta ao tratamento ácido da ausência de glicose e por ácido não são absolutamente coincidentes. Eles também dão algumas indicações úteis para orientar o projeto de transformação alimentar e procedimentos mais eficazes para a inativação de microrganismos contaminantes de alimentos.

A utilização do tratamento ácido para aumentar a produção de bioprodutos por microorganismos tem sido estudada também para produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris*. A adição de ácido acético no início da fase exponencial levou a uma diminuição da taxa de crescimento máxima específica quando comparado com um conjunto de culturas controle. Produção de xantana foi estimulada no final da fase exponencial e fase estacionária. A adição de ácido acético teve aparente contribuição para o crescimento significativo do consumo de glicose (Esgalhado, 2002).

A ativação do metabolismo celular parece estar implicada nos mecanismos de resistência desenvolvidos por células na presença de moléculas lipofílicas e é consistente com a síntese de proteína ativa observada sob stress ácido subletal. Roseiro *et al.* (1996) relataram os efeitos das operações de concentração residual de ácido iso-butírico em culturas contínuas de *X. campestris*. O aumento das atividades das enzimas 6P-gluconato-DH (via PP) e P-isomerase manose (via xantana) foram observados. O aumento específico

das taxas de consumo de glicose, produção de dióxido de carbono e consumo de oxigênio também foram detectadas. Em estudos realizados com *Saccharomyces cerevisiae*, o ácido acético foi utilizado para estimular o metabolismo, aumentando a atividade das enzimas glicolíticas (Pampulha, 1990).

A utilização da estratégia do tratamento ácido para aumentar a produção do produto de interesse pelos microorganismos é bastante estudada nos processos fermentativos. Liu *et al.* (2008) conseguiram redirecionar os fluxos do crescimento celular e formação de ácido lático para a síntese de AH por uma estratégia utilizando o tratamento alcalino intermitente, aumentando assim, a sua produção. O redirecionamento do fluxo de carbono do ácido lático para o ácido acético foi vantajosa, pois não inibiu a síntese de AH pelo ácido lático, e também, possibilitou a formação de ácido acético acompanhada de produção extra de ATP, o qual era necessário para produção de AH (Fong Chong e Nielsen, 2003).

Por ser um estudo recente, ainda não há muitos dados na literatura pesquisada, até o momento, sobre o tratamento ácido em *Streptococcus zooepidemicus* e suas influências na produção de AH.

Pires *et al.* (2009) avaliaram os efeitos do controle do pH do meio de cultura no metabolismo celular e a evolução da massa molar média de AH produzido ao longo das fermentações realizadas, comparando-se dois meios de cultivo, um em pH constante e igual a 7,0, e outro sem o pH constante (condição acidificante). Seus resultados mostram que a massa molar média de AH diminuiu ao longo do cultivo, para ambos os casos, sendo o decréscimo mais intenso no pH neutro com cultivo controlado. No final dos cultivos, a massa molar média de AH foi de $2,1 \times 10^7$ e $4,0 \times 10^6$ Da para os cultivos de pH não

controlados e controlados, respectivamente. Estes resultados podem ser atribuídos à maior suscetibilidade à ruptura das cadeias de AH produzido no cultivo com pH controlado. De acordo com Morris *et al.* (1980), as condições acidificantes contribuem para uma rede de polímero mais resistente à ruptura, uma vez que as interações intermoleculares entrópicas são favorecidas pela supressão de repulsões eletrostáticas.

Além disso, os resquícios de glicose no cultivo não controlado de pH pode ajudar o fortalecimento da rede de AH (Kobayashi, 1994). Embora a atividade da transferase dependa do pH e os mecanismos de controle referentes ao comprimento da cadeia de AH ainda não sejam conhecidos, o pH também pode influenciar no alongamento do AH através da enzima nas mudanças de conformação da molécula, de acordo com a hipótese de pêndulo desenvolvido por Weigel (2009).

Desse modo, os resultados de Pires *et al.* (2009) mostram que o controle do desvio da fonte de carbono para a síntese de AH, em detrimento do crescimento celular no cultivo não controlado de pH, pode indicar um mecanismo de defesa do microrganismo em relação ao tratamento ácido.

Com os resultados desse estudo e os outros dados obtidos da literatura sobre os benefícios do tratamento ácido em bactérias lácticas nos processos fermentativos, podemos utilizar dessa estratégia para aumentar a produção de AH.

2.4.2. Estratégia do Tratamento Salino em Bactérias Lácticas

Outra estratégia bastante empregada para melhorar a produção e rendimento em bactérias lácticas homofermentativas é a utilização do tratamento salino. É uma estratégia menos custosa se comparada ao tratamento ácido.

Em resposta à alta osmolalidade, as bactérias hialofílicas acumulam solutos compatíveis (betaína, prolina) que restauram o turgor e estimulam o crescimento (Csonka e Epstein, 1996). A Membrana incorpora os transportadores de solutos compatíveis, mas os mecanismos moleculares de sua ativação ainda não são conhecidos. Eles são potencialmente sensíveis às alterações da composição da membrana em resposta ao tratamento osmótico. Tais sistemas podem ser considerados como osmosensores (Wood, 1999).

O efeito do tratamento osmótico nas bactérias *Lactococcus lactis* foi observado através do estímulo que a betaína exerce sobre o crescimento dessas bactérias na presença de NaCl. O MQD com a adição de 0,4 M de NaCl, aumentou a taxa específica de crescimento de $0,21 \text{ h}^{-1}$ para $0,53 \text{ h}^{-1}$ com a adição de 1 mM de betaína (Guillot, 2000). As células cultivadas em meio com alta osmolalidade exibem uma forte atividade de transporte quando incubadas em tampão, o qual foi adicionado, 0,3M de NaCl, entretanto, nenhuma atividade foi detectada na osmolalidade baixa, sem NaCl. A taxa inicial de absorção de betaína é aumentada 5 vezes ($6 \text{ vs } 29 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) do que para as células cultivadas em baixa osmolalidade. Assim, ficou comprovado que o NaCl pode alterar a composição da membrana e modificar a ativação osmótica da atividade de transporte de betaína.

Mecanismos de sobrevivência exibidos pelas bactérias expostas a estresses são geralmente referidos como “estresses respostas”. Bactérias do ácido láctico reagem às condições desfavoráveis produzindo proteínas de estresse ou modificando a composição da membrana (Fonseca *et al.*, 2001). A correlação entre a resposta ao estresse e autólise em bactérias lácticas (estreptococos) foi analisada por Husson-Kao *et al.* (1999).

Koch (2008) analisou os efeitos do tratamento salino no rendimento celular, atividade autolítica e sobrevivência à liofilização do *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* para várias concentrações de sal e temperaturas. Depois de um crescimento inicial em condições controladas de crescimento ótimo (pH 5,5, 37 ° C, sem sal), células com crescimento exponencial foram expostas ao sal em diversas concentrações e temperaturas, sem controle de pH e com controle de pH. A autólise foi induzida por concentrações de sal de 2,5 ou 3,5% e reprimida a 53,5 °C e pH 4,5. O NaCl, em concentrações de 2,5 ou 3,5% com temperatura de 53,5 °C, sem controle de pH ou com pH controlado, aumentou significativamente a sobrevivência do microrganismo durante a liofilização, quando comparados à sobrevivência das células em culturas de controle ou de culturas com sal na concentração de 1 e 1,5%. A condição de sobrevivência da bactéria aumentou de 125 e 200 vezes, respectivamente. As culturas cultivadas com sal, 2,5% deram rendimentos elevados de células viáveis em caldos, antes e após a liofilização, com números sendo 27 vezes maior que as culturas controle.

Não se tem ainda muitos estudos na literatura pesquisada sobre os efeitos do tratamento salino na produção de AH. Sabe-se que dentre os íons relacionados à síntese de AH, o magnésio e o manganês destacam-se como cofatores de glicosiltransferases responsáveis pela síntese da cadeia repetida de dissacarídeos (Deangelis, 2002). A atividade da maioria das glicosiltransferases depende de um cátion

divalente que contribui para ligação dos açúcares e nucleotídeos devido à estabilização da conformação da fração pirofosfato, além de auxiliar na estabilização do produto final por meio da neutralização de cargas desenvolvidas no UDP pelos mecanismos catalíticos (Petrova et al., 2001).

Cátions divalentes, como o cálcio, são também importantes na conformação helicoidal da molécula de AH que, por sua vez, é determinante em sua função biológica (Winter e Arnott, 1977). O íon sódio pode influenciar indiretamente a produção do polímero, pois, para algumas bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus*, o sódio está diretamente envolvido na excreção de lactato por meio do simporte de íons sódio e do produto final da fermentação (White, 2000).

Armstrong *et al.* (1997) suplementaram o meio de cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* com citrato de sódio e bicarbonato de sódio, e isso foi benéfico para o crescimento celular. A função do citrato ainda é incerta, embora esteja relacionada com quelacão de íons metálicos. Já o efeito do bicarbonato de sódio, provavelmente, está relacionado com a manutenção das concentrações adequadas de dióxido de carbono (CO₂) no meio de cultivo. O CO₂ pode exercer importante função em reações anapleróticas que envolvem o consumo de CO₂.

Considerando a importância dos íons nos processos metabólicos para produção de AH por via microbiana, Pires *et al.* (2009) realizaram um estudo sistemático visando avaliar a influência dos íons potássio, magnésio, manganês, ferro, cálcio, sódio, zinco e cobre sobre o crescimento de *Streptococcus zooepidemicus*, o coeficiente de rendimento de AH, de glicose, produção de AH e massa molar. A presença de Na⁺ individual acarretou uma redução de 37% na produção de AH, quando relacionado com os controles.

Os efeitos de Na^+ sobre a produção de AH podem estar associados com o metabolismo de desvio de energia para manter o potencial de prótons no interior das células (White, 2000). De acordo com Tlapak-Simmons (2000), cátions monovalentes como K^+ e Na^+ inibem a enzima sintase. O íon Fe^{++} mostrou efeito inibitório quando estava individualmente no meio, o que sugere um comportamento sinérgico com os outros íons.

Assim, os resultados experimentais indicam que a melhor condição para a produção de AH, bem como para o coeficiente de rendimento da AH a partir da glicose, foi o cultivo com ausência de íon Na^+ . A maior massa molecular do polímero foi observada com a presença individual de íon Na^+ , apesar da menor concentração de AH. Portanto, a suplementação do meio com íons pode aumentar as unidades do polímero levando a uma produção de massa molecular superior de AH, e isso vai depender da qualidade do produto desejado (Pires *et al.*, 2009).

Dessa maneira, a estratégia do tratamento salino pode ser um grande aliado no aumento da produção e massa molecular do AH, e isso vai depender do tipo de sal utilizado e dos íons que o compõe.

2.5. Tratamento Ácido e os Mecanismos de Regulação dos Microrganismos: Fatores e Cofatores de Resposta

O maior objetivo da biotecnologia industrial é obter alta concentração do produto de interesse, alta produtividade e alta produtividade de massa celular pelos

processos microbianos. Uma das maneiras de se alcançar esses objetivos é manipular o fluxo de carbono e nitrogênio nas cepas industriais. Um exemplo bem conhecido é a via glicolítica. Em microrganismos eucariotos (Larsson *et al.*, 1997) e procariotos (Yokota *et al.*, 1997), o fluxo através da via glicolítica não é expressivamente aumentado pela super-expressão de genes codificados das enzimas glicolíticas chaves.

Estudos subsequentes demonstraram que a demanda de suprimento de ATP desempenha um importante papel na glicólise (Larsson *et al.*, 2000). Tem sido bem difundido que cofatores tais como ATP/ADP (Aoki *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Yokota *et al.*, 1997; J. Zhou *et al.*, 2009), NADH/NAD (Sanchez *et al.*, 2005), e acetil CoA/CoA (Liu *et al.*, 2006), os quais são compartilhados entre as vias metabólicas, executam papéis importantes na distribuição e taxa de fluxos metabólicos (J. Zhou *et al.*, 2009).

Através de um complicado processo fisiológico, ATP é envolvido em muitas rotas metabólicas e produção de muitos dos metabólitos por cepas industriais. Entretanto, a manipulação do suprimento e a demanda de ATP podem ser realizados por ferramentas poderosas para alcançar objetivos tecnológicos como maior concentração de produto, produtividade, assim como maior resistência às condições ambientais e de estresses (Sheng e Marquis, 2006; Shima *et al.*, 2008); Watanabe *et al.*, 2005; J. Zhou *et al.*, 2009).

A geração de ATP em microrganismos ocorre de duas maneiras: fosforilação ao nível de substrato e fosforilação oxidativa. A manipulação da fosforilação oxidativa parece ser uma forma mais eficiente de regular a concentração intracelular de ATP, porque sob condições aeróbias, a maior produção de ATP provém da via de fosforilação oxidativa. É provável que a disponibilidade de NADH, cadeia de transferência de elétrons, gradiente de

prótons, enzima F_0F_1 – ATPase e suprimento de oxigênio possam ser peças chaves para manipular a disponibilidade de ATP intracelular (J. Zhou *et al.*, 2009).

O microrganismo sob crescimento aeróbio oxida o NADH através da cadeia transportadora de elétrons, na qual o oxigênio é usado como acceptor final de elétrons e grande quantidade de ATP é produzido (Nelson e Cox, 2004). Sob crescimento anaeróbio e na ausência de um oxidante alternativo, a oxidação do NADH pode ocorrer por rotas fermentativas, tais como aldeído desidrogenase (Zhang *et al.*, 2006), ou lactato desidrogenase (Zhu e Shimizu, 2004). Neste caso, a produção de energia é principalmente por fosforilação do substrato (J. Zhou *et al.*, 2009).

Uma das estratégias de manipular a disponibilidade de NADH para ajustar o conteúdo de ATP intracelular é através da super-expressão ou deleção de enzimas chaves relacionadas ao NADH, tais como: acetato quinase (AQ) (Underwood *et al.*, 2002), aldeído desidrogenase (AD) (Zhang *et al.*, 2006), lactato desidrogenase (LD) (Hols *et al.*, 1999) e piruvato-formato liase (PFL) (Hasona *et al.*, 2004).

A produção de metabólitos tais como poli-aminoácidos e polissacarídeos podem ser promovidos com a melhora do suprimento de ATP. O aumento no suprimento de ATP pode melhorar todo o processo porque grande quantidade de ATP está envolvida na formação e na secreção desses metabólitos (J. Zhou *et al.*, 2009).

Desse modo, é provável que uma das respostas ao choque ácido de *S. zooepidemicus* seja a produção de AH se, por exemplo, enzimas como acetato quinase e lactato desidrogenase, desviarem o fluxo de carbono para a síntese de AH. Ou então, a melhora na

disponibilidade de ATP aumente a produção de AH. Portanto, o stress ácido é bastante promissor na área de produção de AH.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASAKA, H.; SUSUMU, S.; YANAGI, M.; FUKUSHIMA, S.; MITSUI, T. J. (1988). Soc. Cosmet. Chem. Japan. 22:35-42.

ALMEIDA, P.F., CAVACO, M., VIEGAS, C.A., AND I. SÁ-CORREIA, (1998). The H⁺-ATPase in the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae* Is Activated during Growth Latency in Octanoic Acid-Supplemented Medium Accompanying the Decrease in Intracellular pH and Cell Viability. Appl. Environ. Microbiol. 64:779-783.

AOKI, R., WADA, M., TAKESUE, N., TANAKA, K., YOKOTA, A. (2005). Enhanced glutamic acid production by a H⁺-ATPase-defective mutant of *Corynebacterium glutamicum*. Biosci Biotechnol Biochem 69:1466-72.

ARMSTRONG, D.C. (1997). The molecular weight properties of hyaluronic acid produced *Streptococcus zooepidemicus*. Queensland: University of Queensland. (PhD. Thesis).

ARMSTRONG, D.C., COONEY, M.J., JOHNS. M.R. (1997). Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. Appl. Microbiol. Biotechnol 47:309-312.

ARMSTRONG, D.C., JOHNS. M.R. (1997). Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Appl. and Environ. Microbiol 63:2759-2764.

BALAZS, E.A. (2004). Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. In: GARG, H.G.; HALES, C.A. Chemistry and biology of hyaluronan. 1. ed. Oxford: Elsevier, p.415-455.

BUCK C. (1983). Glucose transforming enzymes. In: Fogarty, W.M. (Ed.), Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science, New York, pp. 93-129.

CHAMPOMIER-VERGES M. C., ZUNIGA, M., MOREL-DEVILLE, F., PEREZ- MARTINEZ, G., ZAGOREC, M. & EHRLICH, S. D. (1999). Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. FEMS. Microbiol. Lett 180: 297–304.

CARDINAL, E.V., HEDRICK, L.R. (1948). Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. J. Biol. Chem 172:609-612.

CHONG, B.F., NIELSEN, L.K. (2003). Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. Biochem Eng J 16:153-162.

CHONG, B.F., BLANK, L. (1998). Metabolic Engineering of Hyaluronic Acid Production. The Department of Chemical Engineering, University of Queensland, St. Lucia, Australia.

CHONG, B.F., NIELSEN, L.K. (2003). Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. J. Biotechnol 100:33-41.

CHONG, B.F.; BLANK, L.M.; MCLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L.K. (2005). Microbial hyaluronic acid production. Appl Microbiol Biotechnol 66:341-351.

COTTER, D. P., HILL, C. (2003). Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. Microbiology And Molecular Biology Reviews. 67:429-453.

COWMAN, M.K., MATSUOKA, S. (2005). Experimental approaches to hyaluronan structure. Carbohydr Res 340:791–809.

CSONKA, L.N., EPSTEIN, W. (1996). In: Neidhart, F.C. (Ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology, Vol. 1, ASM Press, Washington DC.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. (2003). Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. *Process Biochemistry* 39: 411-414.

DE LUCA, C., LANSING, M., MARTIN, I., CRESCEMZI, F., SHEN, G.J., O'REAGAN, M. & WONG, C.-H. (1995). Enzymatic synthesis of hyaluronic acid with regeneration of sugar nucleotides. *Journal of the American Chemistry Society* 117, 5869–5870.

DEANGELIS, P.L., (2002). Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. *Glycobiology*, 12:9R-16R.

DE WINDE, J.H., THEVELEIN, J.M., WINDERICKX, J. (1997). From feast to famine: adaptation to nutrient depletion in yeast. In: Hohmann, S., Mager, W. (Eds.), *Yeast Stress Responses*. pH Molecular Biology Intelligence Unit, Springer, pp. 7–52.

DORFMAN, A. (1955). Metabolism of mucopolysaccharides of connective tissue. *Pharmacological Reviews* 7, 1–13.

DOUGHERTY, B.A. & DE VAN RIJN, I. (1994). Molecular Characterize of *hasA* from an operon required for hyaluronic acid Synthesis in Group A streptococci. *Journal of Biological Chemistry* 269, 169–175.

ESPOSITO, E.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R. (2005). Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. *Int. J. Pharm.*, 288:35-49.

CANUTO, A.P. Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Goma Xantana por Fermentação no Estado Sólido a Partir de Resíduos e Subprodutos Agroindustriais. Curitiba, 2006. 77 f. Tese (Mestrado em Processos Biotecnológicos), UFPR.

FONSECA, F., BEAL, C., CORRIEU, G. (2001). Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology* 43: 189–198.

GAO, H.J., DU, G.C. and CHEN, J. (2006). Analysis of metabolic fluxes for hyaluronic acid (HA) production by *Streptococcus zooepidemicus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22:399-408.

GREENBERG D.D., STOKER A., KANE S., COCKRELL M., COOK J.L. (2006). Biochemical effects of two different hyaluronic acid products in a co-culture model of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil* 14:814–822.

GUILLOT A., OBIS D., MISTOU M. Y. (2000). Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *International Journal of Food Microbiology* 55:47–51.

HARDINGHAM, T. (2004). Solution properties of hyaluronan. In: GARG, H.G.; HALES, C.A. *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1. ed. Oxford: Elsevier. p.1-19.

HARTKE, A., S. BOUCHE, GIARD, J. C., BENACHOUR A., BOUTIBONNES P., AND AUFRAY Y. (1996). The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* 33:194–199.

HASONA, A., KIMY, HEALY, F.G., INGRAMLO, SHANMUGAMKT. (2004). Pyruvate formate lyase and acetate kinase are essential for anaerobic growth of *Escherichia coli* on xylose. *J Bacteriol* 186:7593–600.

HOLMS, W.H. (1986). The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current Topics in Cellular Regulation* 28:69-105.

HOLMSTRÖM, B., RICICA, J. (1967). Production of hyaluronic acid by a Streptococcal strain in batch culture. *Appl. Microbiol* 15:1409-1413.

HOLS, P., RAMOS, A., HUGENHOLTZ, J., DELCOUR, J., DE VOS WM, SANTOS, H., ET, AL. (1999) Acetate utilization in *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase: a rescue pathway for maintaining redox balance. *J Bacteriol* 181:5521–6.

HUANG, W.C., CHEN, S.J. and CHEN, T.L. (2006) The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic fermentation. *Biochem. Eng. J* 32:239-243.

HUSSON-KAO, C., MENGAUD, J., GRIPON, J.-C., LAURENT, B., CHAPOT-CHARTIER, M.-P. (1999). The autolysis of *Streptococcus thermophilus* DN-001065 is triggered by several food-grade environmental signals. *International Dairy Journal* 9:715–723.

YU H., STEPHANOPOULOS G. (2008) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid, *Metab. Eng* 10:24–32.

IMAI, T., and OHNO, T. (1995). The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3604-3608.

IMPACTOS AMBIENTAIS NA CADEIA PRODUTIVA DA MANDIOCA: MESA REDONDA, Disponível em:

<<http://www.suct.ms.gov.br/mandioca/palestras/Tratamento%20e%20uso%20de%20res%C3%ADduos%20de%20mandioca%20/%20Simone%20Damasceno.doc>>
Acesso em Out. 2006.

ITA, P.S. and HUTKINS, R.W. (1991) Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric and hydrochloric acids. *Journal of Food Protection.* 54:15–19.

ROSEIRO, J.C., ESGALHADO, M.E., EMERY, A.N., AMARAL-COLLAÇO M.T. (1996) Technological and kinetic aspects of sublethal acid toxicity microbial gum production, *J Chem Technol Biotechnol* 65:258–264.

JOHNS, M.R.; GOH, L.T.; OEGGERLI, A. (1994) Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. Biotechnol. Lett., 16:507-512.

ZHOU J., LIU L., SHI Z., DU G., CHEN J. (2008) ATP in current biotechnology: Regulation, applications and perspectives.

KASHKET, E.R. (1985). The proton motive force in bacteria: a crucial assessment of methods. Annu Rev Microbiol 39:219-242.

KHIEKHACHEEE T. (1994). Kinetic studies of cheese starter cultures. PhD thesis, University of New South Wales, Kensington, New South Wales, Australia.

KIM, J., YOO, S., OH, D., KWEON, Y., PARK, D., LEE, C., GIL, G. (1996). Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. Enzyme Microb. Technol 19:440-445.

KOBAYASHI Y., OKAMOTO A., NISHINARI K. (1994) Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights. Biorheol 31: 235-244.

KOGAN, G.; SOLTES, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. (2007). Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnol. Lett 29:17-25.

LARSSON C., PAHLMAN I.L., GUSTAFSSON L. The importance of ATP as a regulator of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 2000;16:797–809.

LEI YU A.B., TING LEI A., RENA X., XIAOLIN PEI A., YAN FENG A. (2008). Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466 Biochemical Engineering Journal 39:496–502.

LIGGET, R.W.; KOFFLER, H. (1948). Corn steep liquor in microbiology. J. Bacteriol., 12:297-311.

LIU L., WANG M, Du G., CHEN J. (2008) Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. Lett Appl Microbiol 46: 383-388.

LIU L.M., LI Y., DU G.C., CHEN J. (2006A) Increasing glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by redirecting ATP production from oxidative phosphorylation to substrate-level phosphorylation. J Appl Microbiol 100:1043–53.

LIU L.M., LI Y., LI H.Z., CHEN, J. (2006B) Significant increase of glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by inhibition of oxidative phosphorylation. FEMS Yeast Res 6:1117–29.

MACEDO, C. A., 2007. Estudo da produção de ácido hialurônico por fermentação de *Streptococcus zooepidemicus* em substrato de caju (*Anacardium occidentale* L) 2007. 193p. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. (Dissertação de Mestrado).

VAN DE GUCHTE, M., SERROR, P., CHERVAUX C., SMOKVINA T., STANISLAV D. EHRlich AND MAGUIN, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. Springer Netherlands. P. 187-216.

EUGÉNIA ESGALHADO M., CALDEIRA A.T., ROSEIRO J. C., NICK EMERY A. (2002). Sublethal acid stress and uncoupling effects on cell growth and product formation in *Xanthomonas campestris* cultures. Biochemical Engineering Journal 12:181–192.

MARKOVITZ, A., CIFONELLO, J.A. & DORFMAN, A. (1959) The biosynthesis of hyaluronic acid by group A streptococcus. Journal of Biological Chemistry 234:2343–2350.

MILLIGAN T.W., DORAN T.I., STRAUS D.C., MATTINGLY S.J. (1978). Growth and amino acid requirements of various strains of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 7: 28-33.

MOSELEY, R.; WALKER, M.; WADDINGTON, R.J.; CHEN, W.Y.J. (2003). Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials – carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. *Biomaterials* 24:1549-1557.

NELSON, D.L., COX, M.M. (2004) Lehninger principles of biochemistry. W. H. Freeman.

OGRODOWSKI, C.S., 2006. Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*: estudo da fermentação de caracterização do produto. 2006. 103p. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. (Tese de Doutorado).

OH, H., WEE, Y.J., YUN, J.S., HAN, S.H., JUNG, S., H.W. (2005). Lactic acid production from agricultural resources as cheap rawmaterials, *Bioresour. Technol.* 96:1492–1498.

O'REGAN, M.; MARTINI, I.; CRESCENZI, F.; DE LUCA, C.; LANSING, M. (1994). Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.16, p.283-286.

PETROVÁ, P.; KOCA, J.; IMBERTY, A. (2001). Molecular dynamics simulations of solvated UDP–glucose in interaction with Mg²⁺ cations. *Eur. J. Biochem.*, 268:5365-5374.

PIRES, A.M. B., (2009). Estudos Metabólicos para Otimização de Condições Nutricionais e de Cultivo para Produção Microbiana de Ácido Hialurônico. 172p. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. (Tese de Doutorado).

PREHM, P. Hyaluronan. In: VANDAMME, E.J.; DE BAETS, S.; STEINBUCHER, A., 2000. Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology,

applications. v.5. Polysaccharides I. Polysaccharides from prokaryotes. Weinheim: Wiley-VCH. p. 379-404.

PRESSER, K. A, RATKOWSKY, D. A. & ROS,S T. (1997). Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2355–2360.

RICHARD, A.; MARGARITIS, A. (2003). Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 82:299-305.

RICHTER, G. (1983). Glucose oxidase. In: Godfrey, T., Reichelt, J. R. (Eds.). *Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry.* The Nature, New York, pp. 428-436.

VAN DE RIJN, I., KESSLER, R.E. (1980). Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. *Infect Immun* 27: 444±448.

ROBERTS, I. S., SAUNDERS, F. K., BOULNOIS, G. J. (1989). *Biochemical Society Transactions* 17:462-464.

ROMEIRO, R.S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Roteiro de aula prática do Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa. 7p. 1999.

ROSA C. S. (2008). Estudo do Ácido Hialurônico Proveniente da Crista de Frango: Extração, Purificação, Caracterização e Atividade Antioxidante. 102p. Universidade Federal de Santa Catarina. (Tese de Doutorado).

Kona R. P., Qureshi N., and Pai J.S. (2001). Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technology* 78:2123-126.

SALMOND, C. V., KROLL, R. G., AND Boot, L. R. (1984). The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 130:2845-2850.

SCOTT, J.E.; CUMMINGS, C.; BRASS, A.; CHEN, Y. (1999). Secondary and tertiary structures in aqueous solution: a C-13 NMR study. *PN A S.*, 96:4850-4855.

SEDEWITZ, B., SCHLEIFER, K.H. & GOTZ, F. (1984). Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic mechanism of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* 160:462–465.

SHENG, J.Y., MARQUIS, R.E. (2006). Enhanced acid resistance of oral streptococci at lethal pH values associated with acid-tolerant catabolism and with ATP synthase activity. *FEMS Microbiol Lett* 262:93–8.

SHIMA, J., ANDO, A., TAKAGI, H. (2008). Possible roles of vacuolar H⁺-ATPase and mitochondrial function in tolerance to air-drying stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *Yeast* 25:179–90.

SHU X.Z., LIU Y., PALUMBO1 F.S., LUO Y., PRESTWICH G.D., 2004. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, v.25, p.1339–1348.

SHU, X.Z, LIU, Y, PALUMBOL, F.S., LUO, Y., PRESTWICH. G.D. (2004). In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 25:1339–1348.

SHULER, M.L., KARGI, F. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts.* Prentice Hall PTR, 2nd ed, 2002.

SIDERIUS, M. MAGER, W.M. (1997). General stress response: in search of a common denominator. In: Hohmann, S., Marger, W. (Eds.), *Yeast Stress Responses.* Molecular Biology Intelligence.

SORRELS, K.M., ENIGL, D.C. and HATFIELD, J.R. (1989). Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 52, 571–573.

KOCH S., OBERSON G., EUGSTER-MEIER E., LEO MEILE A, LACROIX C. (2007). Osmotic stress induced by salt increases cell yield, autolytic activity, and survival of lyophilization of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* International Journal of Food Microbiology 117:36–42.

STOOLMILLER, A.C.; DORFMAN, A. (1969) The biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus*. J. Biol. Chem 244:236-246..

SWANN DAVID A., KUO JING WEN, GLENN D. (1991). Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides. Prestwich Bioconjugate Chemistry. 2:232-241

SWANN, D. A.; SULLIVAN, B. P.; JAMIESON, G.; RICHARDSON, K. R.; SINGH, T. (1990). Biosynthesis of hyaluronic acid. United States Patent: 4,897,349.

SWANN, D.A. & KUO, J.W. (1991). Hyaluronic acid. Biomaterials – Novel Materials from Biological Sources, In: Byrom D (ed.), New York, NY: Stockton Press. ISBN 1561590371.

SYANG-PENG, R., SAINT-WEI C., CHING-FENG M. and HSU-WEI F. (2008). Viscoelasticity and wearability of hyaluronate solutions. Biochemical Engineering Journal. 40:211-217.

SZIRMAI J. A. (1956). Studies on The Connective Tissue of the cock comb: I. Histochemical observations on the ground substance. Journal os Histochemistry and Citochemystry.

SZIRMAI, J. A., M.D., BALAZS, E. A. (1958). Studies on the Structure of the Vitreous Body. *AMA Arch Ophthalmol* 59:34-48.

BITTER T., MUIR H.M. (1962). A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. *Analytical Biochemistry* 4:330 – 334.

TERLECKYJ, B, SHOCKMAN, G.D. (1975). Amino acid requirements of *Streptococcus mutans* and other oral streptococci. *Infect Immun* 11: 656-664.

TERLECKYJ, B., WILLET, N.P., SHOCKMAN, G.D. (1975). Growth of several cariogenic strains of oral streptococci in a chemically defined medium. *Infect Immun* 11: 649±655.

THONARD, J. C., MIGLIORE, S. A., BLUSTEIN, R. (1963). Isolation of hyaluronic acid from broth cultures of Streptococci. *J. Biol. Chem* 239:726-728.

TLAPAK-SIMMONS, V.L., BARON, C.A., WEIGEL, P.H. (2004). Characterization of the purified hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis*. *Biochemistry* 43:9234-9242.

UNDERWOOD, S.A, ZHOU, S., CAUSEY, T.B., YOMANO, L.P., SHANMUGAM, K.T., INGRAM, L.O. (2002). Genetic changes to optimize carbon partitioning between ethanol and biosynthesis in ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 68:6263–72.

VASILIU, S., POPA, M, RINAUDO, M. (2005). Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. *Eur Polym J* 41:923–932.

WATANABE, Y., OSHIMA, N., TAMAI, Y. (2005). Co-expression of the Na⁺/H⁺-antiporter and H⁺-ATPase genes of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 5:411–7.

WEIGEL, P. H., DE ANGELIS, P. L. (1997). Hyaluronan Synthases: A Decade-plus of Novel Glycosyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 282:36777-36781.

WHITE, D. (200). *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. 2. ed. New York: Oxford University Press 548 p.

VIDHYA RANGASWAMY AND DHARMENDRA JAIN, 2008. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* *Biotechnology Letters*. Volume 30, nº 3. P. 493-496.

WILLET, N.P., MORSE, G.E., CARLISLE, A.S. (1967). Requirements for growth of *Streptococcus agalactiae* in a chemically defined medium. *J. Bacteriol* 94: 1247-1248.

WINTER, W.T.; ARNOTT, S. (1977). Hyaluronic acid: the role of divalent cations in conformation and packing. *J. Mol. Biol.*, v.117, n.3, p.761-784.

WOIECHOWSKI, A.L. Desenvolvimento de Bioprocesso para a produção de goma xantana a partir de resíduos agroindustriais de café e de mandioca. Curitiba, 2001. 153 f. Tese (Doutorado em Processos **Biotecnológicos**) – **Setor de Tecnologia, UFPR.**

WOOD, J.M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:230–262.

WOOLCOCK, J.B. (1974). The capsule of *Streptococcus equi*. *J. Gen. Microbiol* 85:372-375.

YOKOTA, A., HENMI, M., TAKAOKA, N., HAYASHI, C., TAKEZAWA, Y., FUKUMORI, Y., ET, A.L. (1997). Enhancement of glucose metabolism in a pyruvic acid-hyperproducing *Escherichia coli* mutant defective in F1-ATPase activity. *J Fermentat Bioeng* 83:132–8.

YUN, Y.H.; GOETZ, D.J.; YELLEN, P.; CHEN, W. (2004). Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials* 25:147-157.

ZHANG, Y., LI, Y., DU, C., LIU, M., CAO, Z. (2006). Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Metab Eng* 8:578–86.

ZHU, J, SHIMIZU, K. (2004). The effect of pfl gene knockout on the metabolism for optically pure D-lactate production by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:367–75.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E

DISCUSSÃO

3.1. APRESENTAÇÃO

Este capítulo será apresentado na forma de artigos científicos, que serão submetidos a periódicos científicos selecionados de acordo com a afinidade do periódico com o aspecto abordado.

3.2. ARTIGOS

3.2.1. THE INOCULUM UNDER ACID STRESS INCREASES THE PRODUCTION OF HYALURONIC ACID *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS*.

Artigo submetido à *Biochemical Engineering Journal*.

3.2.2. KINETS EFFECTS ON THE PRODUCTION OF HYALURONIC ACID WITH THE INOCULUM UNDER ACID STRESS.

Artigo submetido à *Letters in Applied Microbiology*.

3.2.3. INFLUENCE OF CARDIOLIPIN ON THE PRODUCTION AND MOLECULAR WEIGHT OF HYALURONIC ACID FROM *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* CULTIVATION.

Artigo submetido à *Biotechnology Letters*.

**THE INOCULUM UNDER ACID STRESS INCREASES THE PRODUCTION OF
HYALURONIC ACID BY *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS***

Marina Vieira, Aline Mara B. Pires and Maria Helena Andrade Santana*

*Laboratory of Development of Biotechnological Processes
School of Chemical Engineering, University of Campinas-UNICAMP
13083-852, Campinas-SP, Brazil*

ABSTRACT: The pH has a significant effect on the production of hyaluronic acid (HA) during the fermentation by *S. zooepidemicus*. Under acidifying conditions, the cells overspending of ATP for maintenance activities at the expense of the production of HA. Therefore, we assume that by stressing the inoculum to the low pH range developed along the fermentation, the production of HA could be benefited. The inoculum was submitted at pHs 4.5, 5.0 and 5.5 for 15, 30 and 60 min with hydrochloric (HCl) and acetic (CH₃COOH) acids. The fermentations were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks, at initial pH 7.0, temperature 37°C and 180 rpm reciprocal agitation. The results were analyzed in terms of cell growth, production of HA and its yield relative to the cells. The stresses from the HCl were more effective for the production of HA than those from control (absence of acid stress) and CH₃COOH. Under the best conditions (HCl, pH 5.0), the production of HA and yield $Y_{HA/X}$ were 0.48 g/L and about 1.4, which were higher than those of control (0.31g/L and 0.24 respectively). The shift of the carbon metabolic pathway in favor of the production of HA was demonstrated irrespective of exposure time.

. *Keywords: hyaluronic acid, acid stress, fermentation, Streptococcus zooepidemicus.*

* Corresponding author: Phone.: +55 19 3521 3921; Fax: +55 19 3521 3890

E-mail address: mariahelena.santana@gmail.com

1. INTRODUCTION

The hyaluronic acid (HA) is a linear polyanionic biopolymer composed by D-glucuronic acid (GlcUA) and N-acetylglucosamine (GlcNAc) units alternately linked by β -1, 3 and β -1, 4 glycosidic acids. HA is naturally found in the connective tissues of mammals, synovial fluid, skin, tendons, eye's vitreous body and umbilical cord. Due to its unique biological properties, the HA has been used in a wide range of medical, pharmaceutical and cosmetic applications.

The industrial production is by extraction of rooster combs or by microbial production. This last route has advantages of greater control over the production process and requires lower cost in the purification. It is a well-known fact that bacteria from *Streptococci* genus synthesize HA as a self-mechanism of protection or a virulence factor. They are able to hide from the immune system of their hosts by coating themselves with a thick layer of HA. Therefore, environmental stress during cultivation has been used as a mechanism to increase the production of HA by this kind of bacteria.

Studies on some types of stress have been reported in the literature, such as due to excess oxygen [1], and by exposure to alkaline pulses during cultivation [2]. In both cases, changes were found in the carbon flux that controls the competition between cell growth and production of HA in the metabolism of *Streptococci*.

Redirection of carbon flux is an advantageous strategy for the production of HA, because the induction of acetic acid production at the expense of cell growth and production of lactic acid prevents the inhibition caused by excess lactic acid in the culture medium. These changes also promote an extra production of energy (ATP), which is one important key to the production of HA [2; 3a, b].

The acid stress has been used as a strategy to get performance and robustness of lactic acid bacteria during cultivation. Although the effects of acid stress on the bacterial physiology still are not well-known, adaptive responses appear to be a usual mechanism of stress protection in lactic acid bacteria. Proteomic studies performed for the development of tolerance to stress, showed that many proteins and enzymes are induced during the acid adaptation of lactic acid bacteria, mediated by the carbon flux in the cell metabolism [4].

In previous work, the current authors found that in acidifying conditions (natural reduction of the pH along fermentation), the glucose uptake was lesser than in pH 7.0 controlled fermentation, while the production of HA was higher in pH controlled conditions. An analysis of the metabolic fluxes showed that the ATP production was proportional to the specific glucose uptake rates which resulted in similar ATP yields. The excessive ATP in the metabolism (ν_{ATP}) which is consumed by cells for maintenance activities was lower in the cultivation at controlled pH than under acidifying conditions.

The amounts of ATP and NADH produced in the cultivation did not show a close relationship with the HA synthesis, and the changes in the HA production pathway were more related to the distributions of fluxes to the precursors of HA synthesis, UDP-glucuronic acid (UDPG) and UDP-Nacetylglucosamine (UDPNAG) as reported by Chong and Nielsen [3.a, 3.b]. Despite the fluxes of precursors, the HA synthesis also seems to be affected by the pH effects on the activity of hyaluronic synthase. Tlapak-Simmons *et al.* [5] determined as 6.5 to 11.5, as the pH range for the optimal activity of a hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis*.

In the present study, we start from the assumption that an inoculum in acid stress could redirect the flow of carbon to the production of HA because it induces greater robustness in bacteria and it reduces the expense of ATP for cellular maintenance activities

as the pH will be reduced during the fermentation. Hydrochloric (HCl) and acetic (CH₃COOH) acids were chosen because of their differences in the degree of ionization, which can cause different stresses in bacteria cells. The fermentations started at pH 7.0 in order to benefit from the activity of the hyaluronidase synthase. To the best of our knowledge there are no reports in the literature on the effects of acid stress on HA production by *Streptococci*.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Microorganism Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus. ATCC 39920 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) as a lyophilized culture kept in ampoules.

2.2. Culture Maintenance and Pre-inoculum. The stock culture was kept frozen in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 10% glycerol and glass beads at -20°C. The pre-inoculum was prepared by streaking the glass beads onto BHI agar plates supplemented with 5% sheep blood (Biotério Boa Vista, São Paulo, Brazil) and incubating at 37°C during 24 hours.

2.3. Culture Media. The synthetic medium used in the inoculum preparation and fermentation was composed of 60 g.L⁻¹ yeast extract, 25 g.L⁻¹ glucose at pH 7.0, according to Pires and Santana [6]. The glucose solution was autoclaved separately.

2.4. Inoculum Preparation. The colonies from the pre-inoculum were then transferred into 50 mL flask containing 50 mL culture medium and grown on a reciprocal shaker at 150 rpm, 37°C for 12 hours. Next, the inoculum was transferred to a 500 mL flask containing culture medium which was incubated under the same above mentioned conditions during 12 hours. After that, the inoculum was transferred into 100 mL of culture medium, making a total 250 mL of inoculum, which was incubated under the same above mentioned conditions during 12 hours more. A 250 mL total volume of inoculum was prepared according to the described protocol. Cell concentration was measured as a function of the optical density (OD) at 600 nm in samples collected in the final inoculum prepared from the culture medium. A volume containing 6.26 mg of cells was taken to stress.

2.5. Acid Stress. It was prepared 250 mL inoculums, which were equally divided into 10 sterile falcon tubes of 50 mL, containing 25 ml of inoculum, and centrifuged at 10,000 x *g* for 20 minutes. After centrifugation, the supernatant was discarded and 10 mL of each acidified sterile medium, at 4.5, 5.0 and 5.5 pHs were added in the tubes. The cells were re-suspended by vortexing, and the tubes were incubated at 37 °C and 150 rpm in a reciprocal shaker at 15, 30 and 60 minutes. For each time, three tubes were withdrawn from the incubator, in order to have independent triplicates. At the same times, a control tube (no acid treatment) was also withdrawn from the incubator. After that, each test tube was centrifuged at 10,000 x *g* for 20 minutes. The supernatant was discarded and the stressed cells were re-suspended in 10 mL of the culture medium, which were used to inoculate the Erlenmeyer flasks for fermentation.

2.6. Fermentation. The fermentations were carried out in 250 Erlenmeyer flasks containing 100 mL of medium, and incubated at 37 °C, 150 rpm for 24 hours. Each flask was inoculated with 10 mL of cells stressed at the same concentration. Fermentation with the inoculum which was not subjected to acid stress was used as control. The experiments were performed in triplicate.

2.7. Analytical Methods

2.7.1. Cell growth. The cell growth was determined by the cell dry weight according to the gravimetric method.

2.7.2. Cell Viability. The cell viability of the inoculums was determined by micro drops technique adapted by Romeiro *et al.* [7], using the glass beads onto BHI agar plates supplemented with 5% sheep blood. The viability of stressed and non-stressed-cells was compared and determined before the fermentations.

2.7.3. Concentrations of lactate and acetate. Culture samples were filtered through membranes with a pore size of 0.2 µm (Sartorius, Goettingen, Germany) and 20 µL of filtered sample were injected into an ion exchange HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a 7.8 mm x 300 mm HPX-87H fast acid column Aminex (Bio-Rad, Hercules, CA., USA). The mobile phase was composed of 0.004 mol.L⁻¹ H₂SO₄ pumped at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ as described by Chong and Nielsen [3.b]. The column was maintained at 65°C. The peak elution profile was monitored with a Shimadzu RID-6A refractive index detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.7.4. *HA concentration.* Initially the culture broth was centrifuged at 10,000 x g during 20 minutes. The cell-free broth was treated with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 hour for the precipitation of HA. The precipitated HA was redissolved in a 0.15 mol.L⁻¹ NaCl solution. Three precipitation and redissolution steps were performed to increase the yield of HA precipitated. Its concentration was measured by the modified carbazole method by Bitter and Muir [8].

2.7.5. *HA molecular weight.* The HA average molecular weight was determined by size exclusion chromatography, using a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), containing a 7.8 mm x 35 mm Polysep-GFC-P column guard (Phenomenex, Torrance, CA., USA) mounted in series with a 7.8 mm x 300 mm 63 Polysep-GFC-P6000 column of the gel filtration (Phenomenex, Torrance, CA., USA) and a refraction index detector. The analysis conditions were: injected sample of 20 µL, 0.1 mol.L⁻¹ sodium nitrate as the mobile phase, 1.0 mL.min⁻¹ flow rate and 25°C temperature, as suggested by the column manufacturer. Hyaluronic acid (Hyalose, Oklahoma City, Oklahoma, USA) with molecular weight ranging from 50 to 1000 KDa was used as a standard for the calibration curve as described by Balke et al. [9].

3. RESULTS AND DISCUSSION

Cell viability in the inoculum

The cell viability was the same order of magnitude of 10^8 , after the stress and control as shown in Tables 3.1 and 3.2. There were no significant differences in cell viability between the acids, during the exposure time to stress and compared to control, considering the order of magnitude of viability.

Table 3.1 - Cell Viability after Treatment with HCl and control according to the time exposure (CFU.mL^{-1}).

Time (min)	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	Control
15	1.3×10^8	$<10^8$	1.0×10^8	-
30	1.0×10^8	$<10^8$	0.6×10^8	-
60	1.3×10^8	0.7×10^8	1.3×10^8	-
-	-	-	-	3.3×10^8

All fermentations had been inoculated with the same order of magnitude viable cells, in the range 10^8 UFC.mL^{-1} . The differences in the amounts of inoculum did not exceed 5% of the total volume of the medium. The stress produced with both acids did not reduce the cell viability significantly compared to the control, which gives us the the inoculums with the same of viable cells in all fermentations.

Table 3.2 - Cell Viability after Treatment with CH₃COOH and control according to the time exposure (CFU.mL⁻¹).

Time (min)	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	Control
15	<10 ⁸	3.7 x 10 ⁸	0.3 x10 ⁸	-
30	<10 ⁸	4.3 x 10 ⁸	1.2 x10 ⁸	-
60	<10 ⁸	6.0 x 10 ⁸	0.3 x10 ⁸	-
-	-	-	-	3.3 x10 ⁸

Stress with hydrochloric acid

Figure 3.1 shows the effects of stress in the fermentation process when the inoculum suffered a stress with HCl at pHs 4.5, 5.0 and 5.5 during 15, 30 and 60 minutes. The results were analyzed in terms of cell growth, production of HA and its yield relative to the cells.

As it can be seen at pH 4.5, cell growth was similar to the control that has not suffered stress, except for the 60 minute exposure time, which was approximately, 38% greater than the control. In contrast, the production of HA was higher than control during all exposure time, reaching 0.74 g/L (twice higher than the control) for 60 minutes of stress exposure. The inoculum exposed to pH 5.0 did not recover their ability to grow independent of time exposition. However the production of HA, though 36.70% lower than the stress at pH 4.5, was still 33.80% higher than the control.

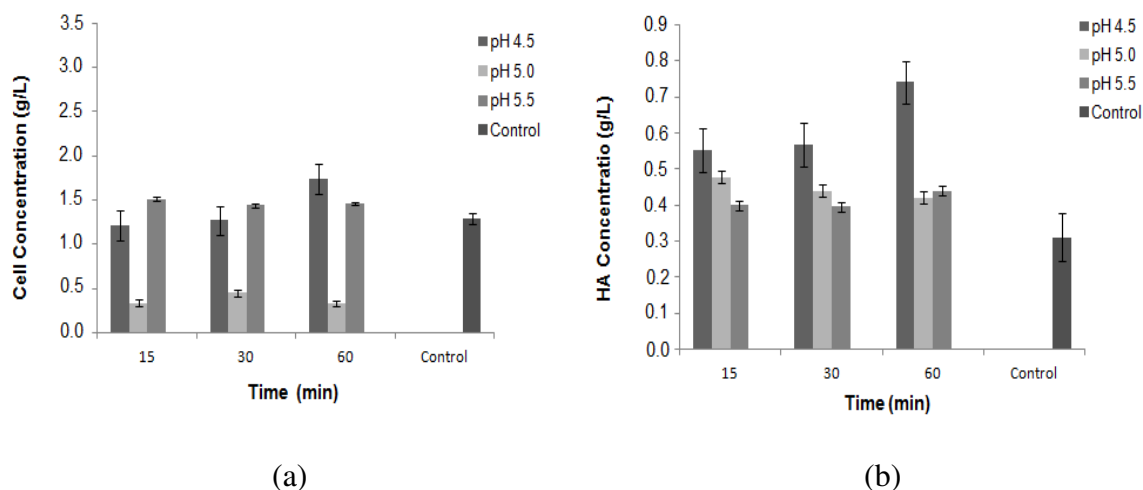


Fig. 3.1 – Comparison between cells (a) and HA (b) concentrations after 24 h of fermentation at initial pH 7.0 with an inoculum under acid stresses with HCl and at the absence of stress (control).

At pH 5.5 the cell growth and production of HA was higher than control and did not vary with time of exposure. However, this was the situation that produced less HA compared to the other pHs.

Stress with acetic acid

The effects of stress with acid CH_3COOH were analyzed for the same parameters. Figure 3.2 shows the results from the exposition of the inoculums at pH 4.5, 5.0 and 5.5 during 15, 30 and 60 minutes.

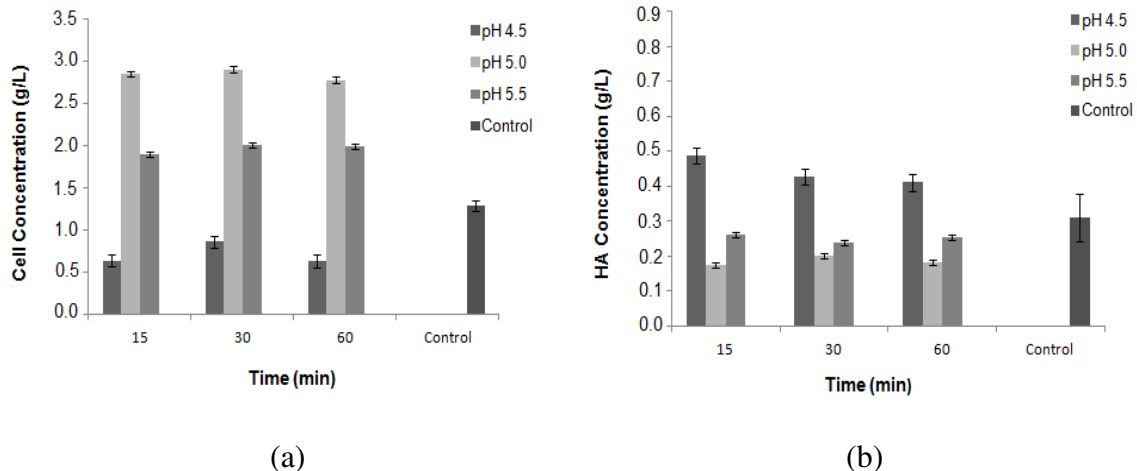


Fig. 3.2 – Comparison between cells (a) and HA (b) concentrations after 24 h of fermentation at initial pH 7.0 with an inoculum under acid stress with CH_3COOH and at the absence of stress (control).

Under stress with CH_3COOH cell growth was higher at pH 5.0 while the pH 4.5 benefited the production of HA. At the best condition (pH 4.5, 15 min) the production of HA reaching 0.49 g/L was 58% higher than the control, while the cell concentration was 34% lower than control. In other pHs and exposure times the cell concentration was higher while the production of HA was always lower than the control.

Table 3.3 shows the yields of HA related to cells from the stresses with both acids, and also compares with the performance of the control.

For the stresses with HCl results show higher yields than the control regardless of exposure time. Yields had a maximum at pH 5.0, which were larger than 1.0, showing the redirection of carbon flux in metabolic pathways favoring the production of HA.

All of these results are consistent with our hypothesis that treatment of the inoculum with acid promotes the adaptation of cells to acidic conditions that are developed during the fermentation, redirecting the flow of energy and carbon for the production of HA. As can

be seen in Figure 3.1, the cellular concentrations produced in fermentation with an inoculum under acid stress at pH 4.5 were equal to or greater than the control, however the concentrations of HA were always higher than the control.

Table 3.3 – Yield ($Y_{HA/X}$) of HA relative to cells from the fermentations under acid stress with HCl, CH₃COOH and at the absence of acid stress (control).

Time (min)	HCl			CH ₃ COOH			Control
	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	
	(g.g ⁻¹)			(g.g ⁻¹)			
15	0.46	1.41	0.26	0.76	0.06	0.14	-
30	0.45	0.98	0.28	0.55	0.07	0.12	-
60	0.43	1.28	0.30	0.65	0.07	0.13	-
-	-	-	-	-	-	-	0.24

In particular at pH 5.0, despite the production of HA is still higher than the control, there was a strong inhibition of cell growth. This behavior produced higher yields than 1.0, effectively demonstrating the redirection of carbon flux in the metabolic pathway for the production of HA at the expense of cell growth. These effects could be related with the findings of Nannen and Hutkins [10] which observed for different strains of streptococci, a critical pH of around 5.0, in which the cell growth is stopped and the cell viability decreased, concomitant with the transmembrane pH gradient decrease. Although the acid stress at pH 5.0 did not decrease cell viability compared to other pHs studied, we believe that in addition, other changes must occur in the cells, preventing them from recovering their growth during fermentation.

At pH 5.5 the yields were similar to control, probably because the pH of the fermentation reaches values in the range of 4.5 to 5.0 and the cells were not adapted.

The stress with acetic acid produced inhibition of cell growth at pH 4.5 as compared to control. The difference in pH compared to the HCl is due to the difference in the degree of ionization of acids. However, in this case, the production of acetic acid and its efficiency in relation to the cells were smaller than in HCl, although still higher than control. In the other pHs, the acetic acid stress benefited cell growth at the expense of the production of HA, with yields lower than control.

These results show that the stress of the inoculum with a strong acid such as HCl favours the production of HA, especially in conditions of inhibition of cell growth. However, kinetic studies should be conducted under conditions of stress, and forced aeration, to see if these benefits are provided, as well as to understand the behavior of glucose uptake and production of intermediate metabolites such as lactic and acetic acids.

Molecular weight of HA

Table 3.4 - HA molecular weight distribution and average molecular weight.

pH	Molecular weight fraction %		Average molecular weight (Da)
	10^5	10^6	
HCl treatment (4.5 pH 60 min)	77.09	22.91	4.09×10^5
Control	70.40	29.60	4.99×10^5

The distribution of the fractions of molecular weight 10^5 and 10^6 , as well as the average molecular weight is shown in Table 3.4, for the stress with HCl at pH 4.5 during 60 minutes. The HA produced with an inoculum under acid stress had the 10^5 Da fraction increased at the expenses of the 10^6 Da fraction compared to control. We believe that this effect is related only to increased production of HA, as previously observed in several other situations in which the increase in production causes a reduction in average molecular mass of HA. This effect is probably due to the limitation of extrusion of the longest chain of HA through the cell membrane, but this hypothesis must be experimentally proven.

4. CONCLUSIONS

The stress produced by the stress of the inoculum with a strong acid such HCl favours the HA production at the expenses of cell growth. This effect was more pronounced when the pH also inhibited cell growth. The degree of dissociation of the acid influenced the effectiveness of stress, which was lower for CH_3COOH than for HCl. The acid stress effectively redirects the flow of carbon in the metabolic pathway for the production of HA by adjusting the inoculum to low pHs that are developed during fermentation.

Acknowledgements

The authors acknowledge CAPES (Brazil) for the financial support, Allergisa Group (Campinas-SP, Brazil) for the maintenance of the bacteria culture and Laboratory of Bioseparations (University of Campinas, Campinas-SP, Brazil) for the availability of HPLC system.

5. REFERENCES

[1] Duan , X.J., Niu, H.X., Tan, W.S., Zhang, X., Mechanism analysis of effect of oxygen on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*, J. Microbiol. Biotechnol. 19 (2009) 299-306.

[2] Liu, L., Wang, M., Du G., Chen, J., Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy, Lett Appl Microbiol. 46 (2007) 383-388.

[3.a] Chong, B.F.; Blank, L.M., McLaughlin, R., Nielsen, L.K., Microbial hyaluronic acid production, Appl. Microbiol. Biotechnol. 66 (2005) 341-351.

[3.b] Chong, B.F., Nielsen, L.K. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase, Biochem Eng J. 16 (2003) 153-162.

[4] Champomier-Verges, M.C, Zuniga, M., Morel-Deville, F., Perez-Martinez, G., Zagorec, M. & Ehrlich, S.D. Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*, FEMS Microbiol. Lett. 180 (1999) 297–304.

[5] Tlapak-Simmons, V.L., Baron, C.A., Weigel, P.H., Characterization of the purified hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis*, Biochemistry 43 (2004) 9234-9242.

[6] Pires, A.M.B. and Santana, M.H.A. Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid, Appl Bioch Biotechnol 162 (2010) 1751 – 1761.

[7] Romeiro, R.S. Micro drops technique for the counting of viable bacterial cells in suspension. Script of a practical class in the Laboratory of Plants Bacteriology – Department of Phytopathology – Federal University of Viçosa (1999) 7.

[8] Bitter, T., Muir, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction, Anal Biochem 4 (1962) 330-334.

[9] Balke, S., Hamielec, A., Leclclair, B., Pearce, S. Gel permeation chromatography. Calibration curve from polydisperse standards, Ind Eng Chem Prod Res Dev 8 (1969) 54-57.

[10] Nannen, N. L., Hutkins, R.W. Intracellular pH effects in lactic acid bacteria, J Dairy Sci 74 (1991) 741-746.

KINECTS EFFECTS ON THE PRODUCTION OF HYALURONIC ACID WITH THE INOCULUM UNDER ACID STRESS

Marina Vieira, Aline Mara B. Pires and Maria Helena Andrade Santana*

*Laboratory of Development of Biotechnological Processes
School of Chemical Engineering, University of Campinas-UNICAMP
13083-852, Campinas-SP, Brazil*

ABSTRACT – This work aims to characterize the kinetic performance of fermentations with the inoculum of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 under acid stress (previous treatment with HCl at pH 4.5 during 60 minutes). The fermentations were carried out in a 3L bioreactor at 2vvm aeration under uncontrolled or controlled pH (7.0). The effects of aeration at controlled pH (7.0) were also studied with the inoculum under acid stress, through the reduction of air supplying to 1vvm. The performances of the fermentations were analyzed through yield parameters and kinetic behavior. The inoculum free of stress was used as a control. The results shown that the inoculum under stress delayed the cell growth due to a lag phase, and deviated the metabolic carbon flux to the production of HA. The large yields of lactic acid relative to glucose decreased the molecular weight of HA after the lag phase. The acid stress in the inoculum increased the HA production compared to control. The best condition for HA production was controlled pH fermentation at 2vvm aeration.

Key-words: hyaluronic acid, acid stress, fermentation, Streptococcus zooepidemicus.

* Corresponding author: Phone: +55 19 3521 3921; Fax: +55 19 3521 3890
E-mail address: mariahelena.santana@gmail.com

INTRODUCTION

Hyaluronic acid (HA) is a natural biopolymer, being the major component of the extracellular matrix and found in all connective tissues. Structurally it is an unbranched glycosaminoglycan copolymer of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine (Weissman and Meyer, 1954). Its biological activity depends on the molecular weight (M_w), such as: low- M_w HA plays an important role in cell signalization and angiogenic activity. High M_w HA is the main component of the synovial fluid in joints (Weindla et al., 2004) and the vitreous humor (Schramm et al., 2012). In the technological field high- M_w HA has been used as a viscosupplement, while low M_w -HA has been used for derivatization of proteins and insoluble compounds (Garg and Hales, 2004; Prestwich et al., 1998; Prestwich, 2001) and for the production of nanoparticles for drug delivery (Yun et al., 2004; Hu et al., 2006). Additionally, *in vivo* tissue regeneration could be modulated by using HA with different molecular weights as a building block for scaffolds (Kim et al., 2009)

The wide range of physical chemical and biological properties of HA has provided many applications, mainly in the medical, pharmaceutical and cosmetics areas. In consequence, the HA is usually a high value-added product, that can range from U.S.\$ / kg 2000 to 60,000 depending on its degree of purity, M_w and physico-chemical characteristics (Kogan et al., 2007).

The microbial production of HA by fermentation processes using Lancefield group A and C *streptococci* bacteria has been industrially used as an advantageous alternative to the conventional rooster combs extracting processes. Therefore, the various aspects of the

fermentation processes have been extensively studied (Armstrong et al., 1997; Chong et al., 2005; Gao et al., 2006).

In fermentations, HA synthesis and cell growth accounts for about 5% and 10% of carbon source, respectively, while 80–85% of carbon source is utilized for the production of lactic and acetic acids (Chong and Nielsen, 2003). Cell growth competes with HA synthesis for carbon source and energy, while lactic acid could inhibit cell growth and HA synthesis. Based on the metabolic characteristics of *S. zooepidemicus*, it is expected that the enhancement of HA production could be realized by decreasing the competition of cell growth and the inhibition of lactic acid on HA synthesis (Liu et al., 2008).

Nowadays, it is known that the stress induced by adverse conditions and sudden environmental changes, alters and redirects the metabolic flux of bacteria due to the evolution of its defense systems. Although the microorganism has specific regulatory gene expressions for adaptation to the environment, the genetic control would be much more complex than the metabolic one. (VanBogelen et al., 1999).

Often, the different types of stress can lead lactic bacteria to express new proteins or enzymes linked to over express the biomolecules. Ogawa (2009) could significantly increase the production of ceramide by *Acetobacter malorum* S24 using acid stress and stress temperature strategies. *Escherichia coli* reacted to salt stress through the redirecting of carbon flux from lactic acid to acetic acid (Canovas et al., 2007). *S. zooepidemicus* under alkaline stress also redirected its metabolic carbon flux from lactic acid to acetic acid, favoring the production of HA instead of cells (Liu et al., 2009).

Previous experimental assays under uncontrolled and controlled pH fermentations with *S. zooepidemicus* shown yield HA/cells higher than 1 for uncontrolled pH fermentations indicating a re-directing of the carbon flux in favor of HA production. The exposition of cells to low pH could inhibit the cell growth and producing more HA as a self defense mechanism. Therefore we started from the hypothesis that an inoculum under acid stress could redirect the flow of carbon to the production of HA, providing greater robustness of bacteria to the acid exposition. In fact, previous assays in Erlenmeyer flaks also shown the exposition of the inoculum cells to hydrochloride acid at 4.5 pH during 60 minutes stimulated the HA production by *S. zooepidemicus* ATCC 39920.

Thus, the aim of this work was to extend the previous findings to investigating the effects of acid stress in the inoculum of *S. zooepidemicus* ATCC 39920, on the kinetic behavior of batch fermentations under forced aeration, at uncontrolled and controlled pH. The results were obtained from uncontrolled and controlled pH fermentations. The influence of the aeration also was investigated in controlled pH fermentations. These results contribute to the understanding of the metabolic modifications induced by the acid stress in the inoculum.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Microorganism. Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus. ATCC 39920 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) as a lyophilized culture kept in ampoules.

2.2. Culture Maintenance and Inoculum Preparation. The stock culture was kept frozen in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 10% glycerol and glass beads at -20°C. The pre-inoculum was prepared by streaking the glass beads onto BHI agar plates supplemented with 5% sheep blood (Biotério Boa Vista, São Paulo, Brazil) and incubating at 37°C during 24 hours. Cell concentration was measured through the optical density (OD = 0.780) of the broth at 600 nm.

2.3. Culture Media. The synthetic medium used in the inoculum preparation and fermentation was composed by 60 g.L⁻¹ yeast extract, 25 g.L⁻¹ glucose at initial pH 7.0, according to Pires and Santana (2010). The glucose solution was autoclaved separately.

2.4. Acid stress in the inoculum. The acid stress was performed as briefly described: the 250 mL inoculum was equally divided in 10 volumes 25 mL each, placed into Falcon tubes previously sterile and centrifuged at 10,000 x g for 20 minutes. Afterwards, the supernatant was discarded and 10 mL of sterile medium acidified with HCl at 4.5 pH were added to the tubes. The cells were re-suspended by vortexing, and the tubes were incubated at 37 °C and 150 rpm in a reciprocal shaker during 60 minutes. After that, each test tube was centrifuged at 10,000 x g for 20 minutes. The supernatant was discarded and the cells were re-suspended in 10 mL of the culture medium at pH 7.0, which were used to inoculate the 3L bioreactor Bioflo III model (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ., USA).

2.5. Fermentation. A 250 mL volume of inoculums prepared as described in item 2.2 was transferred to a 3L BioFlo III fermentation system (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ., USA) with an operating volume of 2.5 L. The agitation rate and the temperature were maintained at 250 rpm and 37°C, respectively, for all fermentations. The bioreactor was sparged with a continuous air supplying at 2 vvm or 1vvm. The fermentations were carried out under uncontrolled or controlled pH (7.0), with inoculums under the acid stress or free of stress as a control. The pH control was performed through the feeding of a sterile solution of 5 mol.L⁻¹ NaOH along cultivation. Samples were withdrawn along 24 hours and their cell mass, HA, glucose, lactate and acetate concentrations were determined. The kinetic of HA molecular weight distribution was also determined.

2.6. Recovery of HA. The products from fermentation broth were centrifuged at 10,000 x g for 30 minutes for cell separation and the HA was precipitated from cell free supernatant with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 hour for the precipitation of HA. The HA precipitated was redissolved in a 0.15 mol.L⁻¹ sodium chloride solution. Three steps of precipitation and redissolution were performed to increase the yield of HA precipitated.

2.7. Analytical Methods

2.7.1. *Cell growth.* The cell growth was determined by cell dry weight according to the gravimetric method.

2.7.2. *Concentrations of glucose, lactate and acetate.* Culture samples were filtered through membranes with a pore size of 0.2 μm (Sartorius, Goettingen, Germany) and 20 μL of filtered sample were injected into an ion exchange HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a 7.8 mm x 300 mm HPX-87H fast acid column Aminex (Bio-Rad, Hercules, CA., USA). The mobile phase was composed of 0.004 mol.L⁻¹ H₂SO₄ pumped at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ as described by Chong and Nielsen (2003). The column was maintained at 65°C. The peak elution profile was monitored with a Shimadzu RID-6A refractive index detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.7.3. *HA concentration.* The HA concentration was determined by the modified carbazol (Bitter and Muir, 1967). Sodium hyaluronate (HylumedTM) from Genzyme Corporation (Cambridge, Massachusetts, USA) was used as a standard.

2.7.4. *HA molecular weight.* The average molecular weight of HA was determined by size exclusion chromatography. It was used a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), containing a (35 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P column guard (Phenomenex, Torrance, California, USA) mounted in series with a (300 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P6000 column of the gel filtration (Phenomenex, Torrance, California, USA) and a refraction index detector (Shimadzu RID-6A). The analysis conditions were: injected

sample of 20 μL , sodium nitrate 0.1 mol.L^{-1} as the mobile phase, flow rate of 1.0 mL.min^{-1} and 25°C temperature, as suggested by the column manufacturer. Hyaluronic acid (Hyalose, Oklahoma City, Oklahoma, USA) with molecular weight ranging from 50 to 1000 KDa was used as a standard for the calibration curve as described by Balke *et al.* (1969).

3. RESULTS

Table 1 shows the yield parameters that define the performance of the fermentations. The profiles along time of uncontrolled (UpH) and controlled (CpH) pH fermentations with the inoculum under acid stress (AS) and the control (C) are shown in Figure 1 and 2. The effects of aeration are presented in Figure 3.

The results in Table 1 show that in UpH fermentations, the yields of the main metabolites related to the consumption of glucose were lesser than 1, including their sum for AS inoculum, while the yields were higher and the $Y_{\text{LAC/S}}$ exceeded 1 in C fermentation. In both cases, the highest fractions of the glucose consumption, or the highest percentages of the produced metabolites were due to the secondary metabolites lactic and acetic acids. The yield $Y_{\text{HA/X}}$ was higher (2.31) with AS inoculum than in C (1.68), but the HA produced per batch (Pt) was 23% higher in the C fermentation.

Figure 1 show the profiles along time for UpH fermentations. For AS inoculums, the cells had a lag time around 8-10h, in which there was the largest consumption of glucose (Figure 1b). After that, the production of HA, cells and acetic acid increased

(Figures 1a, 1c and 1e), reaching concentrations close to control. The production of lactic acid also increased but it was lower than the control (Figure 1d).

The CpH fermentations had lower yields relative to glucose than UpH, except to the yield $Y_{LAC/S}$, and $Y_{X/S}$ which were higher and equal respectively, for AS inoculum. The sum of the yields relative to glucose was higher for the fermentations under controlled pH and inoculum under stress, being more than 1 due to the yield of lactic acid mainly, but they were lower and lesser than 1 for the control. The cumulative production of HA (P_t) was higher (2.44) for the fermentation under controlled pH with AS inoculums.

Comparing with the UpH fermentation, in CpH the highest fraction of the produced metabolites were due to the lactic acid and HA with AS inoculum, while they were due to the lactic acid and cells with C inoculum. The sum of the yields relative to glucose and $Y_{HA/X}$ were higher than 1 for the AS inoculum fermentation only.

Figure 2 shows the profiles of the CpH fermentation at 2vvm aeration. For fermentations with AS inoculum, a lag phase around 8-10h can be observed in all the profiles. After that, the glucose consumption, HA and lactic acid productions (Figures 2b,a,d), were similar for both inocula, but the cell growth and the production of acetic acid were lower for AS fermentation (Figure 2c,e).

Regarding the effects of aeration in CpH fermentations with AS and C inocula, we can see in Table 1 that the reduction of aeration from 2 to 1 vvm caused highest yields in cells and lactate. The sum of yields relative to glucose also was higher and more than 1. However, the $Y_{HA/X}$ was lesser than 1 and P_t was 38,4 % lower.

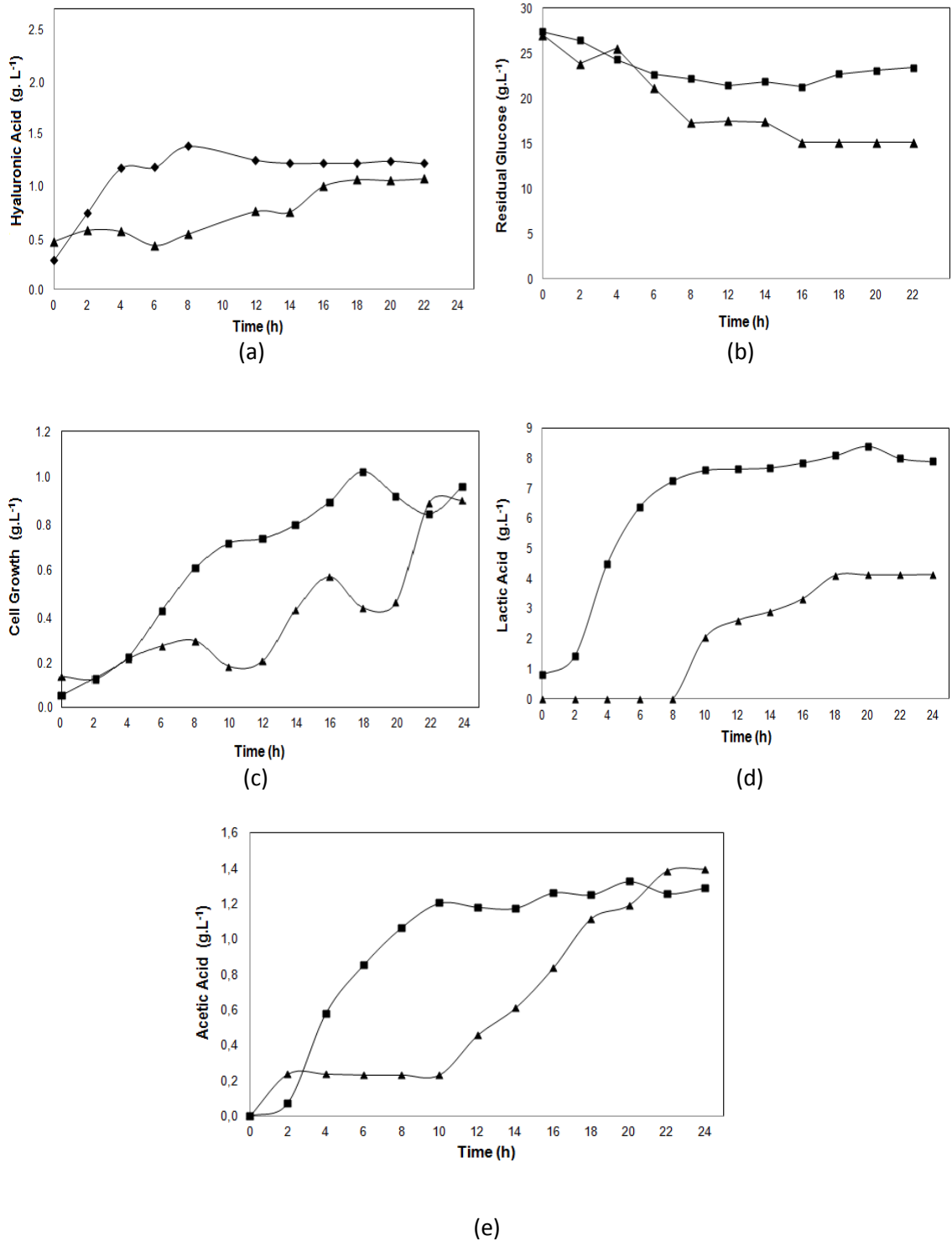


Fig. 1 – Kinetics effects on (a) HA, (b) glucose, (c) cell growth, (d) lactic acid and (e) acetic acid concentrations (g.L⁻¹) under uncontrolled pH fermentations at 2vvm aeration, with inoculum (▲) under acid stress and (■) free of acid stress (control).

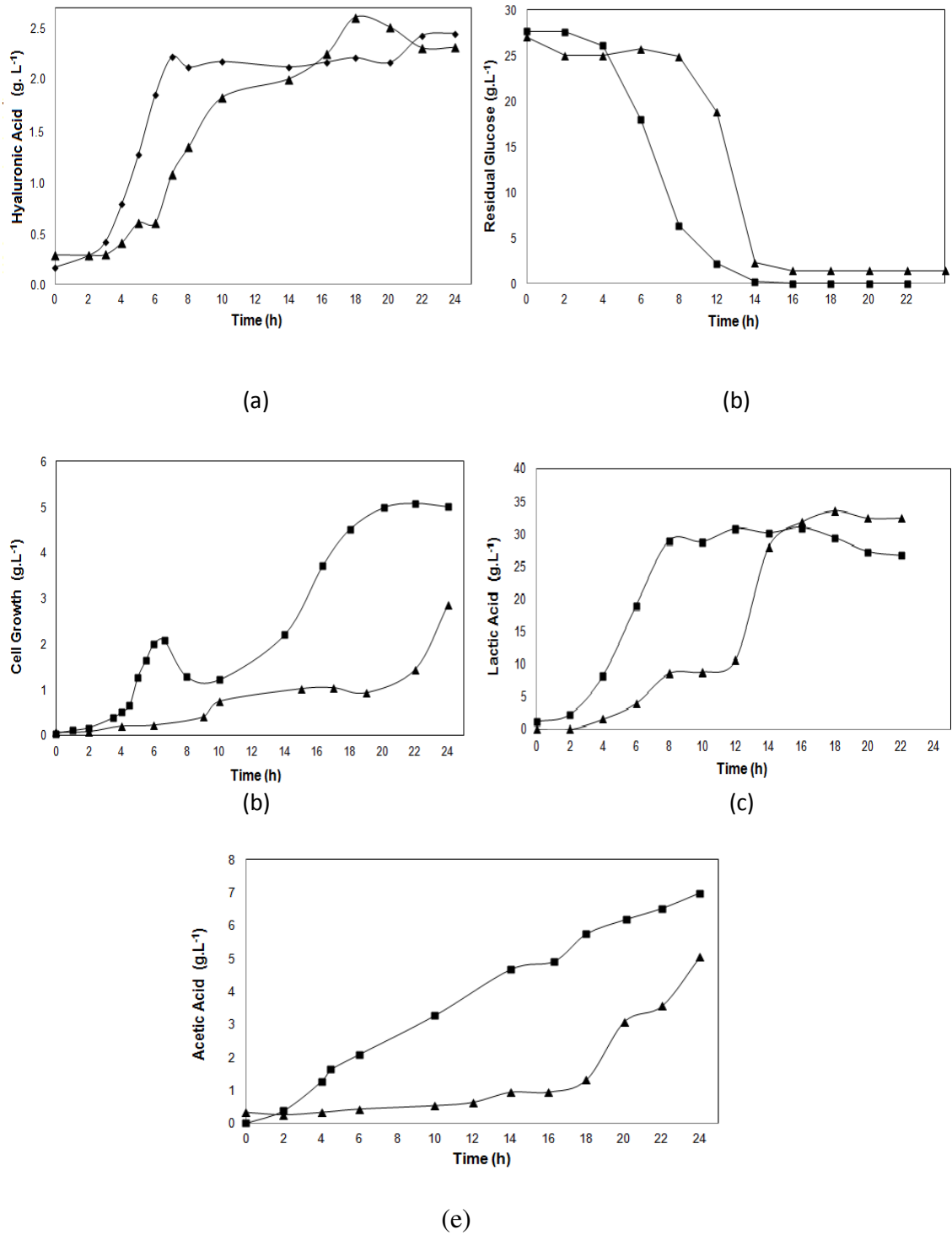


Fig. 2 – Kinetics effects of (a) HA, (b) glucose, (c) cell growth, (d) lactic acid and (e) acetic acid concentrations in controlled pH, at 2vvm aeration and inocula (▲) under acid stress and (■) free of acid stress (control).

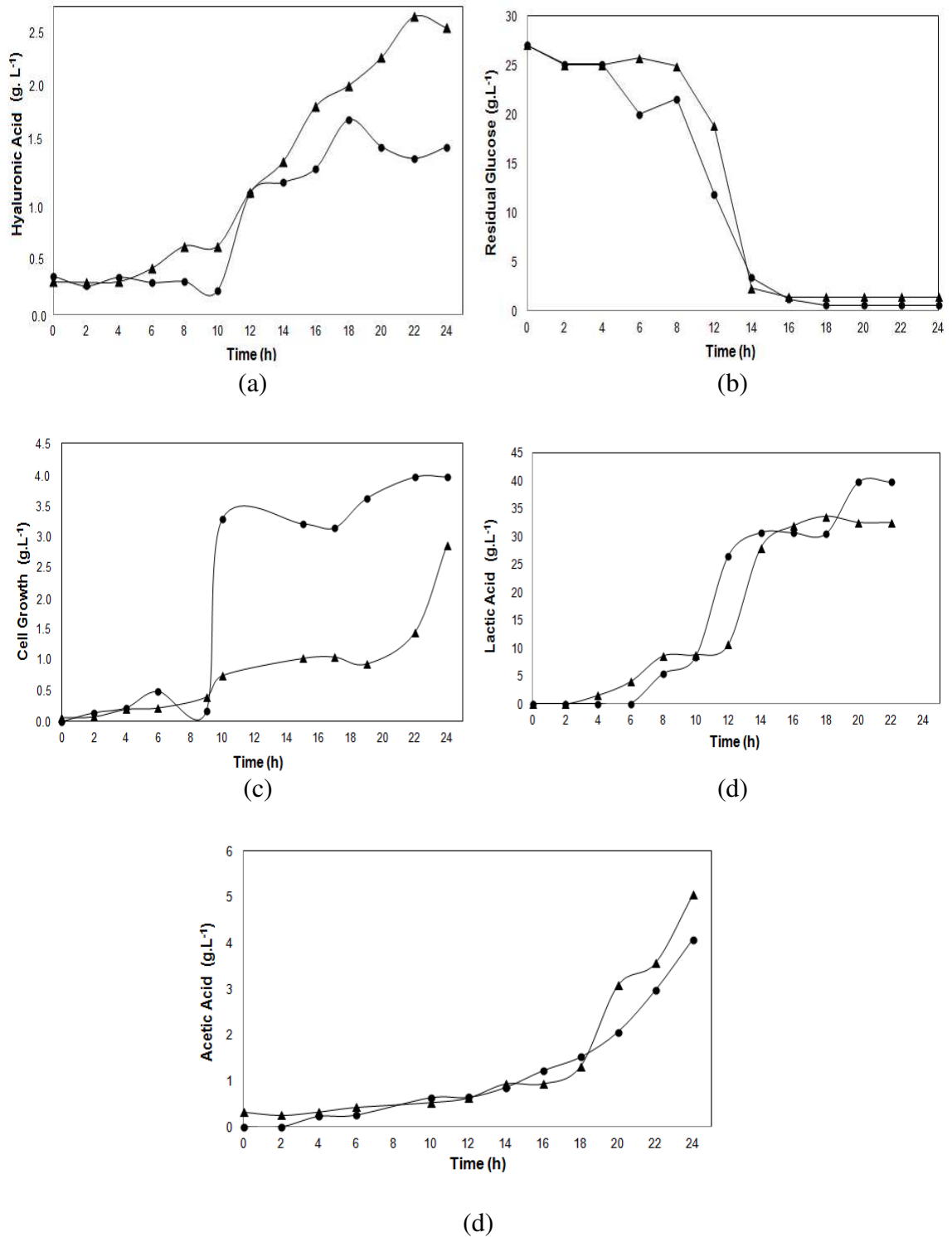


Fig. 3 – Kinetics effects of (a) HA, (b) glucose, (c) cell growth, (d) lactic acid and (e) acetic acid concentrations in controlled pH, at 2vvm aeration and inoculum (●) under 1vvm aeration and (■) 2vvm (both with acid stress).

Table 1 – Performance of batch fermentations under uncontrolled and controlled pH at 2vvm for inoculum of *Streptococcus zooepidemicus* under acid stress and free of stress. Effects of aeration at controlled pH with inoculum under acid stress.

Fermentation parameters	2vvm - uncontrolled pH				2vvm - controlled pH				1vvm - controlled pH	
	Inoculum under acid stress (AS)		Inoculum free of acid stress – Control (C)		Inoculum under acid stress (AS)		Inoculum free of acid stress – Control (C)		Inoculum under acid stress (AS)	
	(g.g ⁻¹)	%	(g.g ⁻¹)	%	(g.g ⁻¹)	%	(g.g ⁻¹)	%	(g.g ⁻¹)	%
Y_{X/S}, P_X	0.03	3.8	0.12	6.9	0.03	2.5	0.07	7.1	0.18	11.8
Y_{HA/S}, P_{HA}	0.09	11.4	0.18	10.3	0.07	5.9	0.05	5.1	0.09	5.9
Y_{LAC/S}, P_{Lac}	0.51	64.6	1.22	70.1	1.07	89.9	0.84	84.8	1.22	80.3
Y_{AC/S}, P_{Ace}	0.16	20.3	0.22	12.6	0.02	1.7	0.03	3.0	0.03	2.0
ΣY_{M/S} (g.g⁻¹)	0.79		1.74		1.19		0.99		1.52	
Y_{HA/X} (g.g⁻¹)	2.31		1.68		1.92		0.84		0.59	
P_{total} (g.L⁻¹)	1.03		1.23		2.44		2.32		1.43	

ΣYM/S – sum of the yields relative to glucose;

PM - percentages of the produced metabolite (Y/ΣY)

C- control, refers to inoculum free of the acid stress.

Pt - the cumulative HA concentration at the end of the fermentation

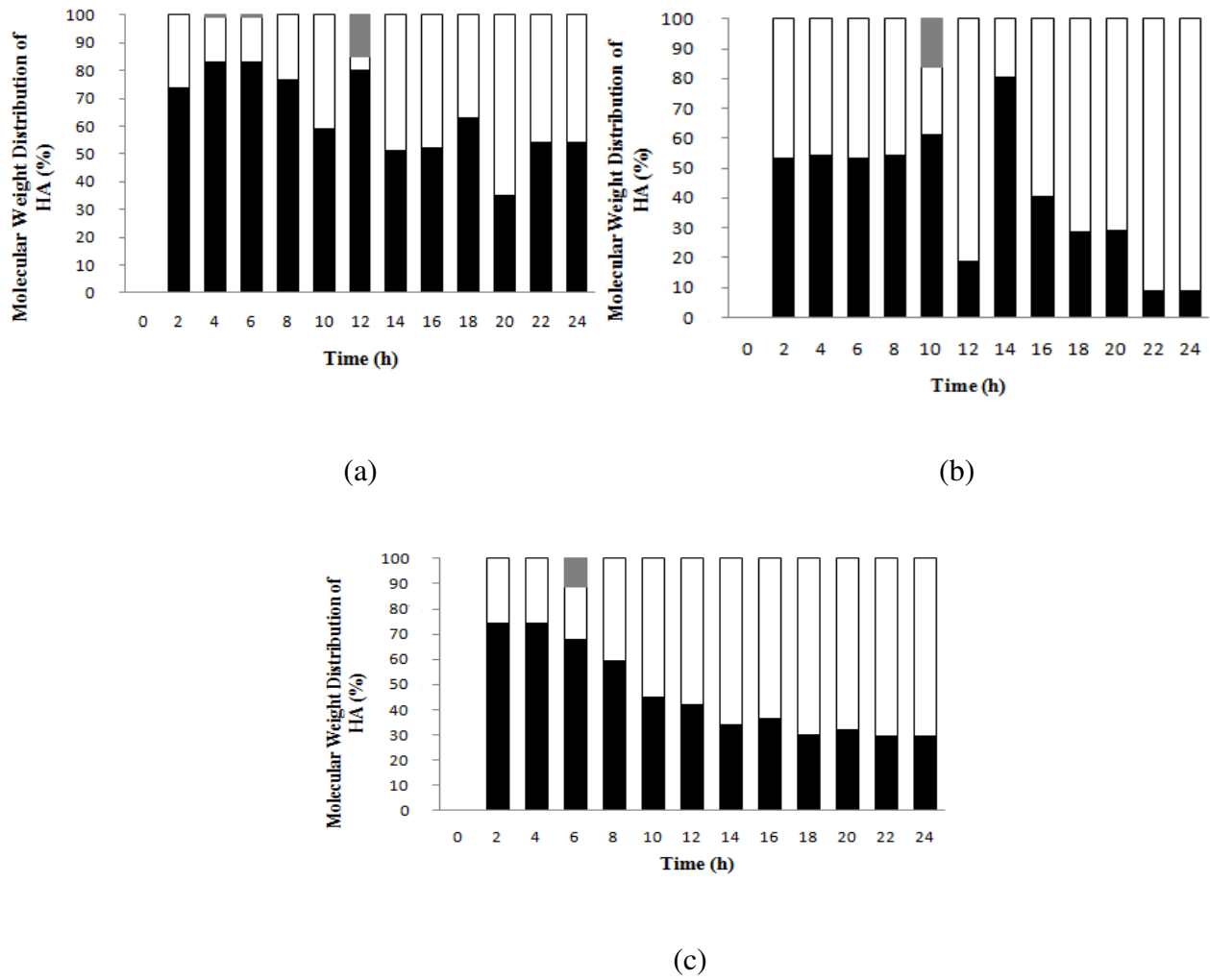


Fig. 4 - Distribution of the molecular weight of hyaluronic acid along fermentations with inoculum under acid stress (a) 2vvm -non-controlled pH, (b) 1vvm – controlled pH and (c) 2vvm – controlled pH. Molecular fraction around (■) 10^7 Da; (■) 10^6 Da and (□) 10^5 Da.

The kinetic effects of aeration are shown in the profiles of Figure 3. A lag phase along 6-8h could be observed in both aeration rates. The larger differences were in the profiles of HA production and cell growth. The reduction of aeration to 1vvm favored the cell growth but reduced the production of HA.

Figure 4 shows the distribution of the molecular weight (M_w) of HA along UpH and CpH with AS inoculum. In all cases, the 10^6 Da fraction remained at the first 8 h, decreasing after that. At the first 8h fermentation, in UpH and 2vvm (Figure 3a) the 10^6 Da fraction was around 80%, while in CpH at 2vvm it was around 70% (Figure 3c) and it was around 50% at 1vvm (Figure 3b). The 10^7 Da fraction was around 10%, and appeared at 12h in UpH, at 10h in CpH and 1vvm and at 6h for 2vvm. After 8h, there was a decline in M_w along time, being more intense in CpH and 2vvm.

4. DISCUSSION

The effects of the acid stress in the inoculum in fermentations carried out under uncontrolled and controlled pH shown that the AS inoculum had a lag time at the first 6-8h fermentation, where the consumption of glucose was higher, due to the energy needs of cells to maintain its internal pH in favorable conditions (Even et al., 2003). As a consequence, the cell growth was delayed and the carbon flux in the metabolism was deviated to the production of hyaluronic acid ($Y_{HA/X} > 1$). The deviation was larger in UpH but the highest cumulative production of HA was observed in CpH fermentation and 2vvm aeration. C inoculum caused deviation in UpH only. In all situations the highest yields

relative to glucose were to lactate, being more than 1 for C in UpH and in CpH with AS. Yields relative to glucose more than 1 indicate consumption of carbon also from the nitrogen source.

The yields of acetic acid were lower than those to lactate, being around 10-20% for UpH and declining to 1.7-2% for CpH. As known, the conversion of piruvate to acetic acid instead lactic acid generates an additional mol of ATP per mol of glucose (Chong et al., 2005). Therefore, UpH generated more energy than CpH for both inoculum.

Reduction of aeration to 1vvm favored the production of cells instead HA. Therefore high aeration rate is required for production of HA in CpH.

Regarding HA M_w , in all case it remained approximately constant during the first 8h, which corresponds to the lag phase of the microorganism under AS inoculums. and declined after that. The higher decline of the 10^6 Da fraction was observed in CpH and 2vvm. In general, lower HA M_w are observed when HA is exposed at the low pH generated by the growth of *S. zooepidemicus* and lactic acid production. In fact, the lactic acid production was higher in CpH and 2vvm than to 1vvm (about 90 and 80% respectively), compared to UpH, which was about 60%. These results explain the highest HA M_w in UpH.

5. CONCLUSIONS

The acid stress in inoculum is a valorous strategy for increase the production of hyaluronic acid by *S. Zooepidemicus*. It delayed the cell growth and deviated the carbon flux to hyaluronic acid. At the best condition (pH controlled fermentation and 2 vvm aeration), the production of hyaluronic acid was 2.44 g/L with an average molecular weight at the magnitude order 10^6 Da.

Acknowledgements

The authors acknowledge CAPES (Brazil) for the financial support and Laboratory of Bioseparations (University of Campinas, Campinas-SP, Brazil) for the availability of HPLC system.

6. REFERENCES

Armstrong, D.C., Cooney, M.J., Johns, M.R. (1997) Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**, 309–312.

Armstrong, D.C., Johns, M.R. (1997) Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2759-2764.

Balke, S., Hamielec, A., Leclkaier, B., Pearce S. (1969) Gel permeation chromatography calibration curve from polydisperse standards. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **8**, 54-57.

Bitter, T., Muir, H.M. (1962) A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* **4**, 330-334.

Canovas, M., Bernal, V., Sevilla, A. and Iborra, J.L. (2007) Salt stress effects on the central and carnitine metabolisms of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **96**, 722–737.

Chong, B.F., Blank, L. Metabolic Engineering of Hyaluronic Acid Production. (1998) The Department of Chemical Engineering. University of Queensland, St. Lucia, Australia.

Chong, B.F., Blank, L.M., McLaughlin, Nielsen, L.K. (2005) Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **66**, 341-351.

Chong, F.B., Nielsen, L.K. (2003) Aerobic cultivation *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. *Biochemical Engineering Journal* **16**, 153-162.

Even, S., Lindley, N.D., Cocaign-Bousquet, M. (2003) Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1963 grown in continuous acidic cultures. *Microbiol.* **149**, 1935-1944.

Gao, H.J., Du, G.C., Chen, J. (2006) Analysis of metabolic fluxes for hyaluronic acid (AH) production by *Streptococcus zooepidemicus*. *World J. Microbiol. Biotechnol* **22**, 399-408.

Garg, H., Hales, C. Chemistry and biology of hyaluronan. Kidlington, United Kingdom: Elsevier Science Publisher and Distributor, 2004.

Hu, Z., Xia, X., Tang, L. (2006) Process for synthesizing oil and surfactant-free hyaluronic acid nanoparticles and microparticles. US Patent 20060040892 A1. Available at: <http://www.freepatentsonline.com/20060040892.pdf>. Accessed 13 April 2009.

Kim, J., Park, Y., Tae, G., Lee, K.B., Hwang, C.M., Hwang, S.J., Kim, I.S., Noh, I., Sun, K. (2009) Characterization of low-molecular-weight hyaluronic acid-based hydrogel and differential stem cell responses in the hydrogel microenvironments. *Journal Biomed Mat Res* **88A**, 967-975.

Kogan, G., Soltes, L, Stern, R., Gemeiner, P. (2007) Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett* **29**, 17-25.

Liu, L., Wang, M., Du, G., Chen, J. (2008) Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Lett Appl Microbiol* **46**, 383-388.

Ogawa, S., Tachimoto, H., Kaga, T. (2009) Elevation of ceramide in *Acetobacter malorum* S24 by low pH stress and high temperature stress. *Journal of Biosci and Bioeng.* **109**, 32-36.

Pires, A.M.B. and Santana M.H.A. (2010) Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. *Appl Bioch Biotechnol* **162**, 1751-1761.

Prestwich, G.D., Biomaterials from chemically-modified hyaluronan. 2001. Available at: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18E.html>. Accessed 22 March 2010.

Prestwich, G.D., Marecak, D.M., Mareck, J.F., Vercruysee, K.P., Ziebell, M.R. (1998) Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *J Controlled Release* **53**, 93-103.

Schramm, C., Spitzer, M.S., Henke-Fahle, S., Steinmetz, G., Januschowski, K., Heiduschka, P., Geis-Gerstorfer, J., Biedermann, T., Bartz-Schmidt, K.U. and Szurman, P. (2012) The Cross-linked Biopolymer Hyaluronic Acid as an Artificial Vitreous Substitute. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 613-621.

Vanbogelen, R.A., Greis, K.D., Blumenthal, M., Tani, T.H. & Matthews, R. Mapping regulatory networks in microbial cells. (1999) *Trends Microbiol* **7**, 320–328.

Weissman, B., Meyer, K. (1954) The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J Am Chem Soc* **76**, 1753-1757.

Weindla, G., Schallerb, M., Schäfer-Kortingc, M., Kortinga, H.C. Hyaluronic Acid in the Treatment and Prevention of Skin Diseases: Molecular Biological, Pharmaceutical and Clinical Aspects (2004) *Journal Pharmacol Biophysical Research* **17**, 207-213.

Yun, Y.H., Goetz, D.J., Yellen, P., Chen, W. (2004) Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials* **25**, 147-157.

INFLUENCE OF CARDIOLIPIN ON THE PRODUCTION AND MOLECULAR WEIGHT OF HYALURONIC ACID FROM *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* CULTIVATION

Marina Vieira, Marina Brito Oliveira and Maria Helena Andrade Santana*

*Laboratory of Development of Biotechnological Processes
School of Chemical Engineering, University of Campinas-UNICAMP
13083-852, Campinas-SP, Brazil*

SUMMARY – This study evaluates the *in vivo* functions of cardiolipin by adding it in the culture medium during the *Streptococcus zooepidemicus* cultivation. The fermentations were carried out in Erlenmeyer flasks, using synthetic medium composed by glucose and yeast extract. Concentrations of 1.5, 3.0 and 4.5 mg/L of an ethanolic solution containing 20 g.L⁻¹ of cardiolipin were added in 100 mL culture medium at the logarithmic growth phase. The production of HA increased from 0.31 g.L⁻¹ (control) to 0.42 g.L⁻¹ for cultivations when added cardiolipin. The HA average molecular weight increased dramatically from 4.99 X 10⁵ (control) to 2.50 x 10⁶Da. These results confirm the previous hypothesis, and point out to the benefits of the increasing of cell membrane permeability on the production and molecular weight of HA.

Key-words: hyaluronic acid, phospholipids, fermentation, Streptococcus zooepidemicus.

* Corresponding author: Phone: +55 19 3521 3921; Fax: +55 19 3521 3890

E-mail address: mariahelena.santana@gmail.com

1. INTRODUCTION

Hyaluronic acid (HA) is a linear polysaccharide of high molecular weight disaccharidic units consisting of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine linked by glycosidic β -1-3 and β -1-4. HA belongs to a group of similar polysaccharides called glycosaminoglycans, which includes sulfate chondroitin, dermatan sulfate and heparin.

HA is usually a high value-added product, that can range from U.S.\$ / Kg 2000 to 60,000 depending on its degree of purity and final physico-chemical characteristic, as its molecular weight. (Kogan et al., 2007). According to Balazs (2004) the more applications are in viscosurgery, visco-increase, viscosdisconexion, viscosupplementation and viscoprotetion. In cosmetics applications, HA is widely used in moisturizers and creams for rejuvenation.

In the human body the highest concentrations of HA are found in synovial fluid, umbilical cord and vitreous humor. In synovial fluid, high concentrations of high ($1.0 - 8.0 \times 10^6$) molecular weight HA provide the required lubrication for the joints. Recent studies show that HA is not inert, also playing important roles in embryogenesis, signal translation and cellular mobility, (Kogan et al., 2007).

The HA commercially available is supplied primarily by extraction from rooster combs and umbilical cord. However, these sources require laborious purification to prevent the adverse effects of impurities contaminants. The HA is also found in prokaryotes, mainly

Streptococcus groups A and C of Lancefield, which synthesize this compound naturally as part of its outer shell (Armstrong and Johns, 1997).

Although it seems strange that some bacteria can produce the same HA that mammals actually happens that these microorganisms have created a clever way to survive in a pathogenic environment. Thus, bacteria such as Group C *Streptococcus equisimilis* (pathogen in animals and sometimes humans), Group A *Streptococcus pyogenes* (a human pathogen) and *Pasteurella multocida* (animal pathogen), are capable of hiding from the immune system of their hosts by coating with a thick layer of HA. Since this barrier of HA, or capsule, has the same structure as the HA of human tissues, these bacteria are not easily recognized by antibodies or phagocytosed by macrophages (Chong et al., 2003).

The HA-producing bacteria have genes able to expressing enzymes such as hyaluronidase synthase (HAS), which are responsible for HA synthesis from its precursors. Although only 64 years after the discovery of AH, the hyaluronidase synthases purification was achieved, currently, it is known that HAS of *Streptococci* are similar to each other, and between the eukaryotic HAS (Chong et al., 2005).

Besides the synthesis and chain elongation of HA inside the cell, the HAS also plays the assisting function in the extrusion of the HA to the external environment. HAS is associated with molecules of cardiolipin (14 to 18 molecules), which preserve the enzyme activity and assist in extrusion of HA. Weigel (1998, 2004) proposed that cardiolipin, along with HAS create a passage in the form of pores in cell membranes, through which the HA is transported to the external environment. In this association, the lipid portion of cardiolipin interact with the lipid bilayer and the hydrophobic portions of the HA chain,

whereas the acidic groups of cardiolipin interact with the enzyme and the hydrophilic portions of the HA chain.

In this context, the addition of extra cardiolipin to the culture medium could benefit the formation and structure of pores in the cell membrane, increasing its permeability. In this study, the influence of the cardiolipin added (*in vivo*) to the culture medium at the exponential growth phase was evaluated on the production and molecular weight of HA.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Microorganism. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) as a lyophilized culture kept in ampoules.

2.2. Culture Maintenance and Inoculum Preparation. The stock culture was kept frozen in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 10% glycerol and glass beads at -20°C. The pre-inoculum was prepared by streaking the glass beads onto BHI agar plates supplemented with 5% sheep blood (Biotério Boa Vista, São Paulo, Brazil) and incubating at 37°C during 24 hours. Colonies were then transferred into 50 mL of culture medium and grown on a rotatory shaker at 150 rpm, 37°C for 12 hours. Next, the inoculum was transferred into 100 mL of culture medium which was incubated under the same above mentioned conditions during 12 hours, after the inoculum was transferred into 100 mL of culture medium which

was incubated under the same above mentioned conditions during 12 hours, totaling 250 mL inoculum. Cell concentration was measured from the optical density ($OD = 0.780$) of the broth at 600 nm.

2.3. Culture Media. The synthetic medium used in fermentations was composed of 60 g.L^{-1} yeast extract, 25 g.L^{-1} glucose (pH 7.0), such as Pires and Santana, 2010.

2.4. Fermentation. The fermentations were carried out in Erlenmeyer flasks containing 100 mL of medium. Cardiolipin was added to the medium at the exponential phase growth in quantities of 1.5, 3.0, and 4.5 mg/L, of an ethanolic solution containing 20 g/L of cardiolipin. The cardiolipin-free medium was used as control. The experiments were performed in triplicate. The bottles are incubated at 37°C , 150rpm for 24 hours.

2.5. Recovery of HA. The products from fermentation broth were centrifuged at 3200 rpm for 30 minutes for cell separation and the HA was precipitated from cell free supernatant with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 hour for the precipitation of HA. The HA precipitated was redissolved in a $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ sodium chloride solution. Three steps of precipitation and redissolution were performed to increase the yield of HA precipitated.

2.6. Analytical Methods

2.6.1. *Cell growth.* The cell growth was determined by cell dry weight according to the gravimetric method.

2.6.2. *HA concentration.* The HA concentration was determined by the modified carbazol (Bitter and Muir, 1967). Sodium hyaluronate (HylumedTM) from Genzyme Corporation (Cambridge, Massachusetts, USA) was used as a standard.

2.6.3. *HA molecular weight.* The average molecular weight of HA was determined by size exclusion chromatography. It was used a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), containing a (35 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P column guard (Phenomenex, Torrance, California, USA) mounted in series with a (300 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P6000 column of the gel filtration (Phenomenex, Torrance, California, USA) and a refraction index detector. (Shimadzu RID-6A). The analysis conditions were: injected sample of 20 μL , sodium nitrate 0.1 mol.L^{-1} as the mobile phase, flow rate of 1.0 mL.min^{-1} and 25°C temperature, as suggested by the column manufacturer. Hyaluronic acid (Hyalose, Oklahoma City, Oklahoma, USA) with molecular weight ranging from 50 to 1000 KDa was used as a standard for the calibration curve as described by Balke et al. (1969).

3. RESULTS AND DISCUSSION

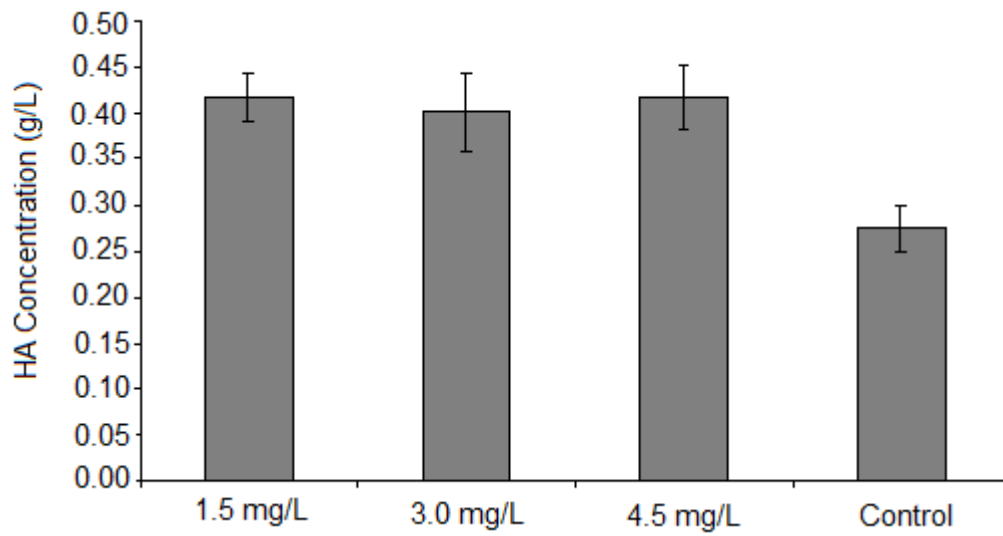
3.1. Hyaluronic Acid Production

Figure 2 (A and B) shows the influence of the cardiolipin on the cellular growth and HA production at the end of the cultivations. The statistical Tukey test indicates that at the 5% of significance level, there is no difference on the generated biomass, with the three concentrations of added cardiolipin in fermentations. However, at the presence of cardiolipin, there was an increase of 47.60% (approx.) on the production of HA while the biomass decreased 33.96%, compared to control (absence of cardiolipin).

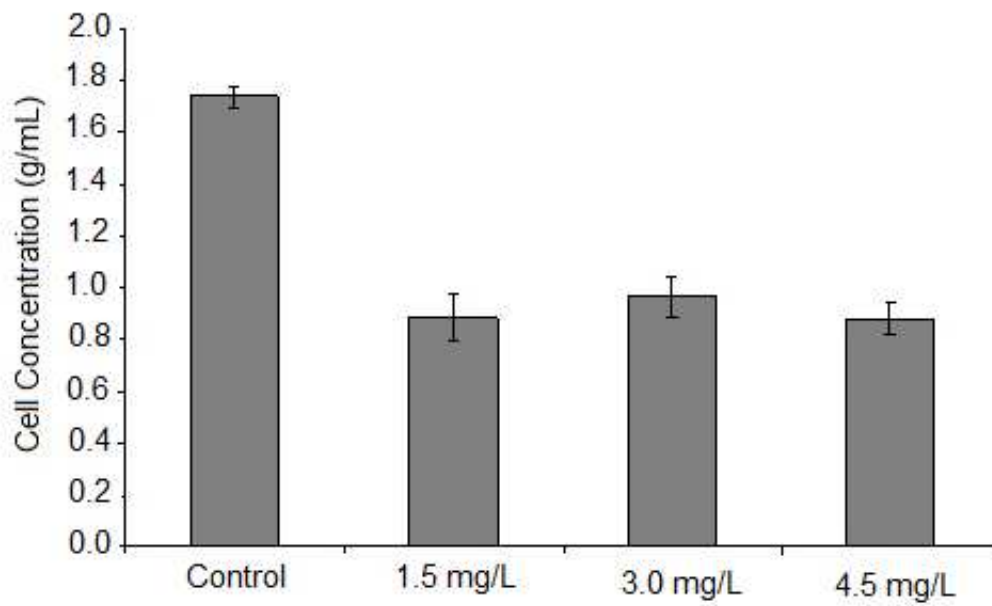
3.2. Distribution of Molecular Weight

The results of the distribution of the HA molecular weight produced by *S.zooepidemicus* are presented in Table 1. The statistical Tukey test indicates that at the 5% of significance level, there is no difference on the fractions of molecular weights around 10^6 and 10^5 Da for the three concentrations of added cardiolipin. However, there was a large shift compared to control. A distribution of the molecular weight fractions with the addition of cardiolipin was 2.50×10^6 and 5.40×10^5 Da (Table 1). Therefore, we can infer that the permeability of the membrane is an important key factor on the molecular weight of HA, according the hypothesis of Weigel (2004).

Triscott and Rijn (1986) studied the successful reconstitution of activity *in vitro* of *Streptococcal* hyaluronic acid synthetase membrane (HAS) using various phospholipids, among which had the best performance for reconstitution of HAS enzymatic activity.



(A)



(B)

Figure 1. Influence of cardioliopin on the HA production (A) and biomass (B).

Phospholipids also have previously been demonstrated to play a role in the activation and stabilization of membrane proteins. In *E. coli*, the enzymes producing peptidoglycan (Taku et al., 1980), and in *Salmonella typhimurium*, the galactosyl transferase system (Romeo et al., 1970) requires phospholipids for activity (Triscott and Rijn, 1986).

Table 1. Distribution of fractions of Molecular Weight of HA produced by *S. zooepidemicus*.

Added Cardiolipin (mg/L)	Fraction around 10 ⁶ (Da)	Percentage of the average Molecular Weight	Fraction around 10 ⁵ (Da)	Percentage of the average Molecular Weight
<i>1.5</i>	2.53 x 10 ⁶	48.06	5.41 x 10 ⁵	51.94
<i>3.1</i>	2.44 x 10 ⁶	49.68	5.47 x 10 ⁵	50.32
<i>4.5</i>	2.46 X 10 ⁶	46.49	5.11 X 10 ⁵	53.50
<i>Control (absence of cardiolipin)</i>	1.21 X 10 ⁶	29.59	4.99 X 10 ⁵	70.41

4. CONCLUSION

The presence of cardiolipin in the fermentation of *Streptococcus zooepidemicus*. is a valuable strategy for production of hyaluronic acid with a high molecular weigh. Cardiolipin did not altered the production of HA, but it provided a large increase on the average molecular weight of HA, from 4.99 X 10⁵ (control) to 2.50 x 10⁶Da.

Acknowledgements

The authors acknowledge CAPES and CNPq brazilian agencies for the financial support, Allergisa Group (Campinas-SP, Brazil) for the maintenance of the bacteria culture.

5. REFERENCES

Armstrong DC, Johns MR. (1997) Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (7):2759-2764. doi: 0099-2240/97/\$04.0010

Balazs EA, 2004. Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. In: GARG, H.G.; HALES, C.A. *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1. ed. Oxford: Elsevier p.415-455.

Balke S, Hamielec A., Leclkaier B, Pearce S. (1969) Gel permeation chromatography. calibration curve from polydisperse standards. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 8:54-57. doi: 10.1021/i360029a008

Bitter T, Muir HM (1962) A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. *Anal Bioch.* 4:330 – 334. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(62\)90095-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(62)90095-7)

Chong BF, Nielsen LK (2003) Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. J. Biotechnol. 100:33-41. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00239-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00239-0)

Chong BF, Blank LM, McLaughlin, NIELSEN LK. (2005) Microbial hyaluronic acid production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66:341-351. doi: 10.1007/s00253-004-1774-4

Kogan G, Soltés L, Stern R, Gemeiner P. (2007) Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnol. Lett. 29:17-25. doi: 10.1007/s10529-006-9219-z

Pires AMB and Santana MHA. (2010) Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. Appl Bioch Biotechnol 162:1751-1761. doi: 10.1007/s12010-010-8956-6

Romeo D, Hinckley A, and Rothfield L (1970) Reconstitution of a functional membrane enzyme system in a monomolecular film: I. Formation of a mixed monolayer of lipopolysaccharide and phospholipid. J. Mol. Biol. 53:491-501. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90078-1](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(70)90078-1)

Taku A, Hirsch TM, and Fan DP (1980) Dissociation and reconstitution of membranes synthesizing the peptidoglycan of *Escherichia coli*. Lipid dependence of the synthetic enzymes. J. Biol. Chem. 255: 2848-2854. PMID: 6244296.

Triscott M X, Van de Rijn I (1986) Solubilization of Hyaluronic Acid Synthetic Activity from Streptococci and Its Activation with Phospholipids. J. Biol. Chem. 261:6004-6009. doi: <http://hwmain.jbc.org/cgi/reprint/261/13/6004>

Weigel PH (2004) Bacterial Hyaluronan Synthases an update: Glycoforum – Hyaluronan Today. Update May 18, 2004. Available at: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06a/HA06aE.html>>.

Weigel PH (1998) Bacterial Hyaluronan Synthases: Glycoforum - Hyaluronan Today. Original issue August 15, 1998. Available at:

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html>.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

4.1. CONCLUSÕES

Do estudo realizado no presente trabalho, conclui-se que o tratamento ácido otimiza a produção do HA por *Streptococcus zooepidemicus* e a sua massa molar. A descrição das alterações enzimáticas decorrentes das perturbações causadas pelo pH permite um maior entendimento do metabolismo, fisiologia e mecanismos de regulação da célula.

As conclusões abaixo se referem aos aspectos específicos abordados neste trabalho:

1. O efeito do tratamento ácido foi mais eficaz com a utilização do HCl comparado ao ácido acético para produção de AH. O nível de dissociação do ácido desenvolve um grande papel na produção do AH e no crescimento celular.
2. O cultivo no qual houve controle de pH após o tratamento ácido no inóculo foi o que mais consumiu glicose como fonte de carbono e também foi o cultivo que obteve as melhores produtividades se comparados aos outros cultivos. Além disso, o pH controlado beneficiou o aumento da massa molar média do AH, que ficou na média do 10^5 Da, isto acontece devido a mudanças no interior celular.

3. A cardiolipina no meio de cultura, provavelmente, aumentou a massa molar do AH quando utilizada *in vivo*, durante o cultivo do *Streptococcus zooepidemicus*. A cardiolipina, possivelmente, aumentou ainda a permeabilidade da membrana celular beneficiando a extrusão do AH através da dos poros da membrana celular previamente demonstrada *in vitro*.

4.2. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS:

1. Estudo detalhado das respostas das células de *Streptococcus zooepidemicus* ao tratamento ácido, antes, depois, e ao longo do cultivo. Utilizando análises genéticas e proteômicas do microrganismo;

2. Estudo das condições de tratamento salino;

3. Estudo da suplementação do meio com levedo de cerveja em substituição do extrato de levedura, como uma alternativa mais barata na composição do meio de cultura, em cultivos realizados em biorreator;

4. Estudo de uma maior faixa de concentração de cardiolipina adicionada ao meio de cultura para fermentação em frascos de erlenmeyer;

5. Estudo da adição de cardiolipina em cultivos realizados em biorreator de tanque agitado.